

**CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS FIJADORAS DE NITRÓGENO Y SU  
RELACIÓN CON SUELOS AGRÍCOLAS EN EL DISTRITO DE RIEGO DE REPELÓN,  
DEPARTAMENTO DEL ATLÁNTICO.**

**LAURA MARÍA ROJAS GERÓNIMO**

**ANDERSON DAVID VALENCIA GARCIA**



**Universidad de la Costa CUC**

**Departamento civil y Ambiental**

**Programa de Ingeniería Ambiental**

**Barranquilla, Colombia**

**2018**

**CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS FIJADORAS DE NITRÓGENO Y SU  
RELACIÓN CON SUELOS AGRÍCOLAS EN EL DISTRITO DE RIEGO DE REPELÓN,  
DEPARTAMENTO DEL ATLÁNTICO.**

**Para optar al título de Ingeniero Ambiental**

**Grupo de investigación en desarrollo agroindustrial sostenible**

**Línea de Investigación: Procesos Agroindustriales**

**TESISTAS:**

**LAURA MARÍA ROJAS GERÓNIMO**

**ANDERSON DAVID VALENCIA GARCIA**

**DIRECTORA:**

**Eliana Andrea Martínez Mera**

**MSc. Ciencias Agronómicas**

**CO-DIRECTORA:**

**Ana Carolina Torregroza Espinosa**

**MSc. Acuicultura y Ecología Acuática**

**Tropical**

**UNIVERSIDAD DE LA COSTA CUC**

**Departamento Civil y Ambiental**

**Programa de Ingeniería Ambiental**

**Barranquilla, Colombia**

**2018**

Nota de Aceptación.

---

---

---

---

---

Presidente del jurado

---

Jurado

---

Jurado

Barranquilla, 10 de abril de 2018

### **Dedicatoria**

*A Dios, por su inmensa gracia, por darme las fuerzas cada día desde el inicio de este proceso, mostrando que Él es quien da mis fuerzas y las multiplica en los momentos en donde estuve cansado, por llevarme a esta meta con su amor y paciencia, por llenarme de sabiduría y fortalezas (Isaías 40:29).*

*A mis padres, Armando Valencia y Audrey García por ser mis apoyos incondicionales y patrocinadores en este sueño de ser ingeniero, por su sacrificio, paciencia y dedicación, por el amor durante esta etapa, por estar ahí en cada momento, por hacer lo imposible para cumplir mis sueños y motivarme a salir adelante.*

*A mi gran amiga, Laura Rojas quien un día decidió emprender este viaje conmigo, por su comprensión, entusiasmo, tiempo y todo el apoyo incondicional para sacar adelante este proyecto de grado, por cada motivación dada durante este periodo, por los años de amistad que llevamos y por los que faltan.*

*A mis tutoras, Eliana Martínez y Ana Carolina Torregroza por el acompañamiento en todo momento, la paciencia que tuvieron, por su confianza y asesoría en este trabajo, por enseñarme, por compartir sus conocimientos para culminar esta etapa, gracias por regalarme de su tiempo, para mí es muy grato haber contado con ustedes como tutoras.*

*A Erika Arbeláez y Ana Villalobos, por su apoyo, paciencia y tiempo en los momentos que necesité de ellas, gracias por su servicio incondicional. A mis amigos Jhorma Medina, Stephanie De la Hoz, Duvan Cervantes, Diego Pimiento, Laura González, Cristian Narvaez, por su compañía, por cada risa y por cada momento compartido con ustedes, gracias por su valiosa amistad.*

**Anderson Valencia García**

### **Dedicatoria**

*A Dios, por el milagro que ha hecho en mí de continuar en pie y viviendo cada día como una gran bendición de su obra; por sus maravillosas bendiciones, su amor y sabiduría para enfrentar el diario vivir.*

*A mi madre, Dalys Gerónimo por su acompañamiento incondicional, por ser la mejor mujer del mundo, lo que la llevó a ser la mejor madre, por su comprensión, ayuda, escucha; por ser mi madre y también mi mejor amiga. Todo para que te sientas orgullosa, mi reina.*

*A mi ángel que está en el cielo, mi padre, esto es para ti.*

*A mi gran amigo y compañero de este proyecto de grado, Anderson Valencia, por invitarme a ser parte de este viaje, por brindarme su confianza y apoyo; y también por escucharme. Por este triunfo y por muchos más. Por estos años y los que continuaran.*

*A mis tutoras, Eliana Martínez y Ana Torregroza por sus conocimientos y acompañamiento brindado, su ayuda y espera, por su paciencia y por confiar y contar con nosotros, Anderson y mi persona.*

*A Erika Arbeláez y Ana Villalobos, las mejores laboratoristas, por su apoyo, ayuda, atención, por su paciencia, su servicio y su tiempo, por su gran amor y calidad humana.*

***Laura María Rojas Gerónimo***

## Contenido

Resumen.....	12
Abstract .....	14
1. Introducción .....	16
1.1 Descripción del Problema .....	17
2. Justificación .....	20
3. Objetivos.....	22
3.1 Objetivo General .....	22
3.2 Objetivos Específicos .....	22
4. Marco Teórico y Estado del Arte.....	23
4.1 Marco Teórico .....	23
4.2 Estado del Arte .....	29
5. Diseño Metodológico.....	35
5.1 Área de Estudio .....	35
5.2 Fase de Campo .....	36
5.3 Fase de Laboratorio .....	37
5.3.1 Aislamiento de Bacterias Fijadoras de Nitrógeno .....	37
5.3.2 Características Fisicoquímicas del Suelo. ....	39
5.3.2.1. pH .....	39
5.3.2.2. Humedad.....	39

5.3.2.3. Carbono Orgánico: .....	39
5.3.2.4. Materia Orgánica .....	40
5.3.2.5. Fósforo disponible: .....	40
5.3.3 Análisis de la Información.....	41
6. Resultados.....	42
7. Discusión .....	63
8. Conclusión .....	70
Bibliografía .....	72
Anexos .....	92

### Lista de Figuras

Figura 1. Ubicación general del Distrito de Riego de Repelón..	35
Figura 2. Diluciones seriadas .....	37
Figura 3. Controles para el aislamiento de las colonias de la cepa-1 en agar levadura manitol	
(A) Control positivo. (B) Control negativo. ....	43
Figura 4. Morfología de las colonias aisladas de la cepa-1 en la dilución 10 <sup>-5</sup> con el medio	
selectivo agar levadura manitol. ....	43
Figura 5. Pruebas para la confirmación de las bacterias fijadoras de nitrógeno para las colonias	
de la cepa-1: (A) Tinción de Gram. (B) Tinción con azul de bromotimol. ....	44
Figura 6. Controles para el aislamiento de las colonias de la cepa-2 en agar manitol Ashby:	
(A) Control positivo. (B) Control negativo. ....	45
Figura 7. Morfología de las colonias aisladas de la cepa-2 en la dilución 10 <sup>-5</sup> con el medio	
selectivo agar manitol Ashby. ....	45
Figura 8. Pruebas para la confirmación de las bacterias fijadoras de nitrógeno para las colonias	
de la Cepa-2: (A) Tinción de Gram. (B) Tinción con azul de bromotimol. ....	46
Figura 9. Controles para el aislamiento de las colonias de la cepa-3 en agar rojo congo:	
(A) Control positivo. (B) Control negativo. ....	47
Figura 10. Morfología de las colonias aisladas de la cepa-3 en la dilución 10 <sup>-5</sup> con el medio	
selectivo agar rojo congo. ....	47
Figura 11. Pruebas para la confirmación de las bacterias fijadoras de nitrógeno para las colonias	
de la Cepa-3: (A) Tinción de Gram. (B) Tinción con azul de bromotimol. ....	48
Figura 12. Densidad poblacional de las colonias aisladas de la cepa-1 en la dilución 10 <sup>-5</sup> en	
distrito de riego de Repelón, Atlántico. ....	49



Figura 13. Densidad poblacional de las colonias aisladas de la cepa-2 en la dilución $10^{-5}$ en distrito de riego de Repelón, Atlántico.....	50
Figura 14. Densidad poblacional de las colonias aisladas de la cepa-3 en la dilución $10^{-5}$ en distrito de riego de Repelón, Atlántico.....	51
Figura 15. Medios de cultivo. ....	93
Figura 16. Tinción de Gram.....	94
Figura 17. Recolección de la muestra para estudio en el DRR.....	95
Figura 18. Siembra del inóculo realizada en los laboratorios CITA.....	96
Figura 19. Titulación para determinar el porcentaje de carbono orgánico realizada en los laboratorios CITA.....	96

**Lista de Tablas**

Tabla 1. Características del suelo en los diferentes puntos de muestreo. ....	54
Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas del suelo en los diferentes puntos de muestreo. ....	55
Tabla 3. Correlación de las UFC del suelo de aislados compatibles con el género <i>Cepa-1</i> spp. y propiedades fisicoquímicas del suelo del Distrito de riego de Repelón, Atlántico. ....	56
Tabla 4. Correlación de las UFC del suelo de aislados compatibles con el género <i>Cepa-2</i> spp. y propiedades fisicoquímicas del suelo del Distrito de riego de Repelón, Atlántico. ....	57
Tabla 5. Correlación de las UFC del suelo de aislados compatibles con el género <i>Cepa-3</i> spp. y propiedades fisicoquímicas del suelo del Distrito de riego de Repelón, Atlántico. ....	58

**Tabla de Anexos**

Anexo 1. Medios de cultivo .....	92
Anexo 2. Tinción de Gram.....	93
Anexo 3. Fase de campo .....	95
<u>Anexo 3.1. Toma de muestra .....</u>	<u>95</u>
Anexo 4. Fase de laboratorio .....	96
<u>Anexo 4.1. Siembra de Dilución en Placas de Petri .....</u>	<u>96</u>
<u>Anexo 4.2. Titulación para hallar porcentaje de carbono orgánico .....</u>	<u>96</u>

### Resumen

El presente trabajo suministra información sobre las poblaciones de bacterias fijadoras de nitrógeno en suelos con actividad agrícola y propone el desarrollo de alternativas sostenibles orientadas a mantener los microorganismos del suelo para incrementar la productividad de los suelos del Distrito de Riego de Repelón, Atlántico. Durante la época seca (junio de 2016), se evaluaron las bacterias fijadoras de nitrógeno y se correlacionaron con las propiedades fisicoquímicas de los suelos agrícolas. Se tomaron muestras de suelo (hasta 25 cm de profundidad) en diez puntos en el Distrito de Riego de Repelón. Los suelos presentaron variaciones en sus características. El pH del suelo varió entre ligeramente ácido, con valores que oscilan entre 6.41 y 6.56, a neutro con valores entre 6.6 y 7.5. El porcentaje de materia orgánica fue alto, osciló entre 2.91% a 6.46%. El fósforo total del suelo presentó altas concentraciones (entre 76.2 ppm -113 ppm). Por el contrario, se registraron bajos porcentajes de humedad entre 0.91% y 5.99%, relacionado con las condiciones climáticas de la zona por la temporada de sequía. De igual manera, se evaluó la densidad poblacional de bacterias fijadoras de nitrógeno por medio de diluciones seriadas ( $10^{-5}$ ). Estas se sembraron en medios de cultivo selectivos libres de nitrógeno: agar rojo congo, agar levadura manitol y agar asbhy. Se aislaron tres cepas, las cuales presentaron morfologías macroscópicas y celulares similares. La prueba de azul de bromotimol y tinción de gram confirmaron que las cepas aisladas correspondieron a bacterias fijadoras de nitrógeno. La densidad poblacional mostró variaciones en los aislamientos: cepa-3 ( $1.6 \times 10^8$  UFC/g de suelo) > cepa-2 ( $5.2 \times 10^7$  UFC/g de suelo) > cepa-1 ( $4.4 \times 10^7$  UFC/g de suelo). La zona norte del distrito de riego presentó mayor población de las cepas 1 y 3. Por el contrario, la zona centro mostró mayores poblaciones de la cepa 2. Estas variaciones posiblemente se encuentran asociadas con las características fisicoquímicas del suelo. Finalmente, se

correlacionaron los parámetros fisicoquímicos del suelo con las densidades poblacionales.

Únicamente, las colonias aisladas de la cepa-2 mostraron significancia ( $P \leq 0.05$ ) con el fósforo total. Teniendo en cuenta los resultados de los parámetros fisicoquímicos del suelo y los aislados bacterianos, se puede afirmar que durante la época seca, la ausencia de actividades agrícolas por la escasez de agua y la falta de operación del distrito de riego; las propiedades fisicoquímicas del suelo mejoran presentando condiciones adecuadas para el establecimiento de bacterias fijadoras de nitrógeno. No obstante, se deben implementar prácticas que favorezcan las condiciones del suelo para garantizar el mantenimiento de los microorganismos edáficos, debido a que son componentes importantes para la salud de los ecosistemas.

***Palabra Clave:*** bacterias fijadoras de nitrógeno, suelos agrícolas, manejo sostenible.

### Abstract

The present work provides information on the populations of nitrogen-fixing bacteria in soils with agricultural vegetation and proposes the development of sustainable alternatives aimed at maintaining soil microorganisms to increase the productivity of the soils of the Irrigation District of Repelón, Atlántico. During the dry season (June 2016), nitrogen-fixing bacteria were evaluated and correlated with the physico-chemical properties of agricultural soils. Soil samples were taken up to 10 points in the Irrigation District of Repelón. Soils according to variations in their characteristics. The pH of the soil varied between the acid, with values that oscillate between 6.41 and 6.56, a neutral with values between 6.6 and 7.5. The percentage of organic matter was high, ranging between 2.91% and 6.46%. The total phosphorus of the soil with the highest concentration (between 76.2 ppm -113 ppm). On the other hand, humidity percentages between 0.91% and 5.99% were registered, related to the climatic conditions of the area during the dry season. Similarly, the population density of nitrogen-fixing bacteria was evaluated by means of serial dilutions (10<sup>-5</sup>). These were seeded in selective nitrogen-free culture media: Congo red agar, mannitol yeast agar and asbhy agar. Three strains were isolated, which have similar macroscopic and cellular morphologies. The bromothymol blue test and gram stain confirmed that the isolated strains correspond to nitrogen-fixing bacteria. The population density and the flow rate in the isolates: strain-3 ( $1.6 \times 10^8$  CFU / g of soil) > strain-2 ( $5.2 \times 10^7$  CFU / g of soil) > strain-1 ( $4.4 \times 10^7$  CFU / g of soil) ). The northern area of the irrigation district had a greater population of strains 1 and 3. On the contrary, the largest area of the population, the largest populations of strain 2. These variations may be so with the physicochemical characteristics of the soil . Finally, it correlates with the physical-chemical parameters of the soil with the population densities. The only references of strain-2 showed significance ( $P \leq 0.05$ ) with total phosphorus.

Taking into account the results of the physicochemical parameters of the soil and isolated bacteria, it can be stated that during the dry season, the absence of agricultural activities due to lack of water and the lack of operation of the irrigation district; the physicochemical properties of the soil improve, presenting adequate conditions for the establishment of nitrogen fixing bacteria. However, practices that favor soil conditions must be implemented to ensure the maintenance of soil microorganisms, because they are important components for the health of ecosystems.

***Key word:*** nitrogen-fixing bacteria, agricultural soils, sustainable management.

## 1. Introducción

En la agricultura el nitrógeno es el principal nutriente para el crecimiento de las plantas (García, 2011). No obstante, el proceso de mineralización del nitrógeno es lento (1 a 3% del N total del suelo (Escobar et al., 2011). En suelos carentes de nitrógeno ha sido necesario implementar el uso de fertilizantes nitrogenados para aumentar el rendimiento de los cultivos, sin embargo, el uso de estos de manera indiscriminada y las pérdidas producidas posterior a la aplicación (por medio de erosión, lixiviación y volatilización), pueden ocasionar problemas graves de contaminación en los suelos. Estos problemas están relacionados principalmente con el incremento del contenido de sal, la disminución del pH en los suelos y la contaminación de aguas subterráneas (Martínez-Mera et al., 2016; Iturri & Buschiazzi, 2016). A su vez, estas alteraciones en las características fisicoquímicas de los suelos y dependiendo de las condiciones climáticas de la zona, pueden traer consigo modificaciones en la distribución, diversidad y abundancia de los microorganismos (Mahmood et al., 2006; Gupta & Roper, 2010).

La identificación de fuentes alternas de fertilización que disminuyan los impactos sobre los suelos es necesario para el desarrollo de la agricultura sustentable y el manejo sustentable del suelo (Martínez-Mera et al., 2016;). De igual forma, el manejo de diversas prácticas culturales (rotación de cultivos, abonos verdes, aplicación de materia orgánica, entre otras) permite que los sistemas agrícolas requieran menos aplicaciones externas de energía (fertilizantes).

Adicionalmente, estas prácticas favorecen la actividad microbiana e incrementan la diversidad, de tal forma que se establezcan diversas relaciones tróficas que contribuyan a la sanidad y fertilidad de los suelos (Ferrera & Alarcón, 2001). Hamid-Dar et al., (2012) afirman que la diversidad microbiana es considerada como indicador de la calidad del suelo ya que los microorganismos desempeñan un papel fundamental en los procesos de transformación de la



materia orgánica y en los ciclos biogeoquímicos proporcionando la disponibilidad de algunos nutrientes fundamentales para el crecimiento de las plantas.

Dentro de los microorganismos más importantes en los suelos agrícolas se encuentran las bacterias fijadoras de nitrógeno (BFN) (e.g. géneros como *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Clostridium*, *Beijerinckia*, *Frankia*, entre otras), ya que por medio de estas ocurre la fijación del nitrógeno disponible en la atmósfera, quedando bioquímicamente disponible para las plantas (Philippot & Germon, 2005). La fijación biológica de nitrógeno es crítica para la productividad del ecosistema (Dahal et al., 2017). Además, estas bacterias tienen la facultad de promover el crecimiento vegetal a través de la capacidad de propiciar la síntesis de hormonas reguladoras del crecimiento (e.g. ácido indolacético), de inhibir el crecimiento e incidencia de patógenos mediante la secreción de sustancias de tipo antibióticas y de solubilizar fosfatos (Escobar et al., 2011).

Para promover y fortalecer el establecimiento sistemas agrícolas sustentables se requiere del conocimiento fundamental de los diversos componentes que lo integran y que pueden ser determinantes en la funcionalidad de los mismos (Ferrera & Alarcón, 2001). En Colombia se han realizado pocos estudios sobre esta temática (e.g. Mantilla-Paredes et al., 2009). Particularmente para las zonas agrícolas del sur del Departamento del Atlántico, la información cualitativa y cuantitativa concerniente a la microflora del suelo es muy escasa y no hay reportes de investigaciones realizadas sobre este aspecto.

### **1.1 Descripción del Problema**

El departamento del Atlántico en la zona sur cuenta con cinco distritos de riego, siendo el más importante el Distrito de Riego de Repelón (DRR) con una extensión de 3.200 hectáreas

beneficiando a 425 familias (Villa Del Río, 1998). Con la implementación del DRR los suelos agrícolas aledaños a este, pueden verse afectados por la presencia de sustancias no deseables como el exceso de fertilizantes y/o plaguicidas. Aunque estos se utilizan para aumentar la producción y erradicar organismos que pueden afectar el rendimiento de los cultivos, el uso indiscriminado de estas sustancias ocasiona efectos negativos en el suelo reduciendo la actividad microbiana y pérdida de biomasa (Silva-Arroyave & Correa-Restrepo, 2009), incluso llegando a contaminar aguas subterráneas y por absorción de las raíces de la planta, trasladarlo a los tejidos vegetales de la fruta (Plaza-Bolaños et al., 2012).

El suelo como un sistema agrícola de producción depende de sus propiedades físicoquímicas y biológicas, puesto que estas son determinantes en los rendimientos de la producción; así como también sobre la calidad y la salud del mismo (Bautista-Cruz et al., 2004). Las propiedades biológicas del suelo representan un sistema donde se asocian diferentes formas de vida con compuestos orgánicos e inorgánicos del mismo, por lo tanto, es de vital importancia estudiar los microorganismos como las bacterias fijadoras de nitrógeno del suelo debido a que esta es importante para la productividad del ecosistema permitiendo un intercambio constante de nutrientes y minerales evitando así los efectos erosivos y la pérdida de fertilidad del suelo (Dahal et al., 2017; Philippot & Germon, 2005). Las bacterias fijadoras de nitrógeno están entre los microorganismos más importantes en los suelos agrícolas, estos se reconocen como de vida libre no simbióticos (*Clostridium*, *Beijerinckia*, y géneros *Azotobacter*) y bacterias móviles del suelo (los géneros de *Rhizobium*, *Frankia*, y cierta especie de *Azospirillum*) asociado con diferentes especies de plantas.

Las bacterias fijadoras de nitrógeno son destacadas debido a su capacidad de transformar el nitrógeno inerte de la atmósfera en una manera biodisponible para las plantas (Philippot & Germon, 2005). Las bacterias juegan un papel indispensable en los ecosistemas naturales, debido a que las interacciones que realizan con las plantas constituyen el principal mecanismo de aporte de nitrógeno, elemento esencial para el desarrollo óptimo de cultivos (Baca et al., 2000). En la agricultura sustentable, las bacterias fijadoras de nitrógeno son fundamentales para los diferentes procesos de aprovechamiento de los ecosistemas, puesto a que permiten que el ciclo de nitrógeno sea cerrado, y de esta manera, se evita la interferencia de sustancias químicas externas que adicionalmente alteran las propiedades fisicoquímicas del suelo. Las diversas investigaciones se han desarrollado sobre este tema, Kuiper et al., (2004), Tonitto et al., (2006), Griffin et al., (2000) & Balkcom & Reves (2005) demostraron la importancia y el efecto de la presencia de los microorganismos en procesos agrícolas, el uso sostenible del suelo, disminuyendo las aplicaciones de fertilizantes inorgánicos, así como la relación entre las poblaciones de microorganismos y las propiedades del suelo.

En este sentido, el objetivo de la investigación es generar información sobre la calidad microbiológica (aislados bacterianos compatibles con bacterias fijadoras de nitrógeno) de suelos con actividad agrícola y de esta manera, proponer el desarrollo de alternativas sostenibles orientadas a aumentar la productividad de los suelos del Distrito de Riego de Repelón, Atlántico.

## 2. Justificación

Las propiedades físicas, biológicas y químicas del suelo son determinantes para su calidad y salud. Las prácticas agrícolas que incluyen la aplicación de sustancias químicas, como plaguicidas y/o fertilizantes, pueden reducir la actividad microbiana y afectar la densidad de las poblaciones, ocasionar la pérdida de la biodiversidad, influir en la pérdida de fertilidad de los suelos: acidificándolos, contaminar cuerpos de agua y las áreas naturales, entre otros; representando amenazas para la salud del ser animal y humano (Pedraza, 2008; Cordero et al., 2014; Martínez-Mera et al., 2016; Iturri & Buschiazzi, 2016). El nitrógeno presente en suelos cultivables procede de diversas fuentes (restos de cultivos, abonos, estiércol, fertilizantes comerciales, así como por la fijación del nitrógeno atmosférico realizada por ciertos microorganismos) este nitrógeno puede encontrarse en bajos niveles de concentración, esto debido a la extracción de cultivos, lixiviación, erosión y volatilización (Navarro y Navarro, 2003).

Las bacterias y hongos son responsables de transformaciones fisicoquímicas importantes para la producción agrícola (AEFA, 2017). Las bacterias, son las más abundantes y representan, aproximadamente, el 5% del total de la materia orgánica seca presente en el suelo. La densidad de las bacterias depende de factores como la temperatura, el contenido de humedad, el pH, la materia orgánica, el carbono orgánico y el fósforo disponible del suelo, entre otros (Silva & Correa, 2009). De igual manera, el tipo y diversidad de la vegetación son factores bióticos que influyen en las poblaciones microbianas. Los microorganismos en el suelo son determinantes en el ciclaje de nutrientes, su ausencia afecta los procesos biogeoquímicos. Por lo tanto, la disponibilidad de nutrientes naturales en el desarrollo de las plantas influye en el rendimiento de los cultivos (Yanine, 2010).

En Colombia, se han realizado pocos estudios sobre este tema particularmente en áreas agrícolas del sur del Departamento del Atlántico (Mantilla-Paredes et al., 2009). El municipio de Repelón cuenta con escasa información cualitativa y cuantitativa de la microflora del suelo, además de que no hay reportes de investigaciones realizadas sobre este aspecto. Por lo que es necesario este estudio, debido a que genera información sobre la salud del suelo representada en las poblaciones de las bacterias fijadoras de nitrógeno y a sus propiedades fisicoquímicas. De igual manera, los reportes de las densidades poblacionales de las bacterias fijadoras de nitrógeno son una base para el conocimiento de la dinámica ecológica e implementación de prácticas agrícolas amigables con el medio ambiente que permitan aumentar las poblaciones de microorganismos edáficos presentes en esta zona del departamento del Atlántico.

### **3. Objetivos**

#### **3.1 Objetivo General**

Aislar y caracterizar macroscópicamente bacterias fijadoras de nitrógeno presentes en suelos agrícolas del distrito de riego de Repelón, departamento del Atlántico.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Describir los morfotipos de las bacterias fijadoras de nitrógeno presentes en suelos agrícolas del Distrito de Riego de Repelón, Atlántico.
- Estimar la densidad poblacional de las bacterias fijadoras de nitrógeno presentes en suelos agrícolas del Distrito de Riego de Repelón, Atlántico.
- Establecer la relación existente entre parámetros fisicoquímicos del suelo y la densidad poblacional de bacterias fijadoras de nitrógeno en suelos agrícolas del Distrito de Riego de Repelón, Atlántico.
- Proponer alternativas de productividad agrícola sostenible que permitan garantizar el establecimiento y el mantenimiento de bacterias fijadoras de nitrógeno en suelos agrícolas del Distrito de Riego de Repelón, Atlántico.

## 4. Marco Teórico y Estado del Arte

### 4.1 Marco Teórico

El nitrógeno es el principal elemento nutricional esencial para el desarrollo y productividad de cultivos (Cordero et al., 2014). Se encuentra entre los tres macronutrientes indispensables (junto con el fósforo y potasio) para el cumplimiento de las funciones vitales y la productividad primaria de cualquier ecosistema está limitada por la disponibilidad de este elemento (Ibarra-Sánchez, 2012). Por lo tanto, su demanda es en mayor cantidad y por ende es necesario abastecer el nitrógeno que es extraído del suelo con las cosechas (Córdoba-Bautista, 2009).

Este elemento nutricional, se encuentra en la atmósfera como gas, ocupa aproximadamente el 80%, es un reservorio no disponible para la mayoría de organismos, a excepción de algunos microorganismos como algas, bacterias y actinomicetos. Para que el nitrógeno pueda ser utilizado por los organismos debe encontrarse como ion amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) o nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), cambio que sucede por medio de la Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN) (Mayz-Figueroa, 2004). Este proceso puede desarrollarse por medio de una asociación simbiótica entre las raíces de las plantas leguminosas con algunas especies de bacterias fijadoras de nitrógeno o por microorganismos fijadores de vida libre. La FBN, es el principal aporte de este elemento a ecosistemas sin fertilización química (Ibarra-Sánchez, 2012) y es el segundo proceso más importante después de la fotosíntesis que se realiza en la naturaleza (Silvia et al., 2009). Adicionalmente, reduce la degradación del suelo por el aporte de materia orgánica, debido a que esta no puede utilizarse por las plantas directamente, por lo que deben descomponer y mineralizarse, procesos que son llevados a cabo principalmente por microorganismos del suelo (Celaya-Michel & Castellanos-

Villegas, 2011; Cordero et al., 2014).

La asociación simbiótica entre las raíces de las plantas leguminosas con algunas especies de bacterias fijadoras de nitrógeno ocurre en dos etapas: la infección y el desarrollo de los nódulos radicales. El proceso inicia con el reconocimiento de la combinación adecuada de los organismos (planta y bacteria) y adherencia de la bacteria a los pelos radicales de la leguminosa, posteriormente ocurre la invasión del pelo radical que da formación a un canal de infección y por este ocurre el desplazamiento de las bacterias hacia la raíz principal. Luego, se presenta una diferenciación de las bacterias en un nuevo tipo, conocidas como bacteroides, dentro de las células de la planta, finalmente, la división de células bacterianas y vegetales forman el nódulo radical (Wang, et al., 2002). Posteriormente, la simbiosis se presenta cuando la bacteria entra en contacto con la raíz y las paredes de la célula se disuelven formando un nódulo, por consecuencia de enzimas. Cuando la bacteria se encuentra dentro del nódulo, obtiene nutrientes necesarios como, compuestos del carbono, y el oxígeno de la planta hospedera, esta misma recibe los compuestos nitrogenados producidos por la bacteria a partir del nitrógeno gaseoso de la atmósfera del suelo, a este proceso se le denomina fijación simbiótica del nitrógeno (FAO, 2016). La bacteria que forma parte del nódulo, es llamada rizobio; este no puede fijar el nitrógeno independientemente, por lo que requiere oxígeno; pero la enzima que cataliza la reacción principal de fijación de nitrógeno que es la nitrogenasa, que se ve inactivada por el oxígeno, por lo tanto, la proteína reguladora leghemoglobina, controla los niveles de oxígeno en el interior del nódulo radicular, el contenido de hierro hace que la concentración de oxígeno en el interior del nódulo sea constante (García, 2011).

La enzima nitrogenasa, actúa de igual forma tanto en la fijación de nitrógeno por



asociación simbiótica como en la de vida libre, pero existen algunas diferencias como la fase de crecimiento de los microorganismos durante la cual se tiene lugar la fijación del nitrógeno, la cantidad de nitrógeno fijado por gramo de material celular, la eficiencia de la fijación de nitrógeno y el destino del nitrógeno fijado. Entre los microorganismos fijadores de nitrógeno de vida libre existen anaerobios facultativos y aerobios; dentro de cada uno existen géneros capaces de tomar energía de sustancias químicas, conocidos como quimiótrofos, o por la luz, fotótrofos; también, se resalta que es mayor la fijación biológica por asociación simbiótica que por fijación en vida libre (Fernández et al., 2002).

En agricultura el nitrógeno es el principal nutriente para el crecimiento de las plantas, por lo tanto, en los suelos carentes de nitrógeno los rendimientos de los cultivos son bajos (García, 2011). Esta situación se ve reflejada en los suelos de zonas áridas y semiáridas que se caracterizan por bajo contenido de materia orgánica debido a la escasa cubierta vegetal. El escaso nitrógeno contenido en la materia orgánica de estas zonas se transforma en compuestos inorgánicos, por lo que se registra al nitrógeno como limitante para la productividad de las plantas en esos ecosistemas, teniendo en cuenta que no siempre se cuenta con las condiciones ideales para su actividad en cuanto a temperatura y humedad. Una planta con deficiencia de nitrógeno sufriría clorosis, manifestando una coloración amarillenta de tallos y hojas, falta de desarrollo y debilidad. Contrario a esto, cuando una planta tiene suficiente nitrógeno, sus hojas y tallos crecen rápidamente. Los valores de mineralización de nitrógeno son mayores, bajo los arbustos y el dosel de árboles, especialmente en las leguminosas; a mayor cubierta de árboles o arbustos se incrementa la presencia de islas de fertilidad, mayor mineralización de nitrógeno y fertilidad del suelo (Celaya-Michel & Castellanos-Villegas, 2011).

Las bacterias que fijan el nitrógeno en vía libre fertilizan naturalmente el suelo proporcionando una forma biodisponible del nitrógeno, que pueda ser utilizada por las plantas. La presencia de este tipo de bacterias en los suelos también permite al suelo mantener un intercambio constante de nutrientes y minerales, evitando así los efectos erosivos y la pérdida de fertilidad del suelo (Philippot & Germon, 2005). Las bacterias promotoras de crecimiento en plantas (BPCP) se caracterizan por incrementar el crecimiento y la productividad vegetal, entre los organismos más conocidos están las especies pertenecientes a los géneros *Rhizobium* y *Azospirillum* (Córdoba-Bautista, 2009). Las BPCP pueden clasificarse en dos grupos: BPCP donde la bacteria afecta a las plantas suprimiendo los otros microorganismos y BPCP con capacidad de control biológico. En el primer grupo, a través del propio metabolismo de la bacteria (solubilizando fosfatos, produciendo hormonas o fijando nitrógeno) se afecta directamente el metabolismo de la planta, es decir, incrementa la toma de agua y de minerales mejorando el desarrollo radicular, e incrementando la actividad enzimática de la planta o ayudando a otros microorganismos benéficos para que beneficien las plantas (Bashan & Holguín, 1998). El segundo grupo, promueve el crecimiento de la planta al suprimir los fitopatógenos, dentro de ellas se encuentra el género *Azospirillum* y *Azotobacter*, también bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico, e igualmente, aumentan la capacidad de solubilización del fósforo orgánico e inorgánico presente en el suelo, colonizan raíces de las plantas produciendo fitohormonas como giberelinas que inducen la germinación de las semillas y control al crecimiento vegetal; citocininas, hormona que fomenta y favorece el crecimiento de yemas laterales y, auxinas, sustancias promotoras de crecimiento vegetal. Estas hormonas vegetales favorecen el aumento en la captación de los nutrientes (Murphy et al., 2002.). Particularmente, el género *Azotobacter* se caracteriza por la fijación no simbiótica de nitrógeno (bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre), síntesis de antibióticos y vitaminas

(Becking, 2006). Las especies de *Azotobacter* se encuentran en diferentes condiciones climáticas y generalmente en suelos ligeramente ácidos o alcalinos (Kennedy et al., 2005), están distribuidas en diferentes ambientes de suelo, agua y sedimentos (Aquilanti et al., 2004). Adicionalmente, el género *Azospirillum* esta representado por bacterias que perduran a lo largo del tiempo en suelo rizosférico, permaneciendo en diferentes especies de plantas lo que le dá un mejor desarrollo a los cultivos (Parra & Cuevas, 2002; Barassi, et al., 2007; Córdoba-Bautista, 2009). Sobreviven a altas condiciones ambientales desde climas tropicales hasta templados, minimizan los efectos negativos del estrés abiótico en las plantas, causado por condiciones de sequía, salinidad, metales pesados y pH extremos (Barassi et al., 2007; Mendez et al., 2014). Vélez et al., (2008) reportan que la concentración de bacterias en la rizósfera es mucho mayor que en el resto del suelo. Posiblemente los altos niveles de nutrientes que se hallan en la zona que rodea *Azospirillum* presenta otra característica como la habilidad de colonizar el interior de las plantas y ocupar nichos protegidos contra el oxígeno, lo que la convierte en el grupo más promisorio de diazótrofos asociados con gramíneas y otras plantas no leguminosas, inducen resistencia a agentes patógenos y proveen elementos necesarios como el nitrógeno (Parra & Cuevas, 2002). Por otra parte, *Rhizobium* pertenece al grupo de bacterias móviles del suelo, que son atraídas hacia la raíz por compuestos que esta libera. De igual manera, nodulan en raíces de leguminosas de climas templados y subtropicales, pero a diferencia de *Azospirillum* necesitan algo de oxígeno para fijar el nitrógeno. Esta especie de forma independiente no puede fijar nitrógeno, sino que requieren de una planta hospedante (García, 2011). El establecimiento del género *Azospirillum* en la raíz de la planta es un factor crítico para promover el crecimiento vegetal. Los efectos de esta bacteria sobre este crecimiento vegetal han permitido que se utilicen en la formulación de biofertilizantes como una alternativa en la agricultura, debido a que es

capaz de producir y excretar reguladores de crecimiento vegetal tales como las auxinas, citocinas, y giberelinas (Tien et al., 1979; Spaepen et al., 2009; Molina-Favero et al., 2008).

Muchas de las propiedades físicas y químicas del suelo están influenciadas por las propiedades biológicas del mismo, por lo tanto, los microorganismos del suelo son responsables de transformaciones fisicoquímicas importantes para la producción agrícola debido a que intervienen en el aprovechamiento de nutrientes (Sivila de Cary & Hevé, 1994). De igual manera, la relación entre los parámetros fisicoquímicos del suelo determina las especies de microorganismos y la densidad poblacional, puesto a que influye en las relaciones que se establecen entre los componentes bióticos y abióticos del ecosistema (Silvia et al., 2009). Entre estos parámetros se encuentran factores químicos como concentraciones de sales y metales, temperatura, pH, concentración de aluminio y magnesio, disponibilidad de fósforo y cantidad de micronutrientes. Así mismo, los factores físicos del suelo como la erosión y compactación, al igual que los factores biológicos como la presencia de virus y bacterias fitopatógenas que influyen negativamente en la nodulación de raíces en las asociaciones simbióticas bacteria-leguminosa (Jiménez, 2007).

Teniendo en cuenta la importancia de los microorganismos que se desarrollan en el suelo, y la función del suelo como un ecosistema con diversidad de poblaciones microbianas, se establecen relaciones con la fertilidad del suelo y los ciclos biogeoquímicos son determinantes en los sistemas de producción agrícola sostenible. Además, su potencial uso con aplicaciones en la agricultura para incrementar el rendimiento de los cultivos y la biodiversidad del suelo al ser utilizados como bioinóculos. La producción de estos se puede desarrollar en laboratorio o en campo. Para la obtención de bacterias fijadoras de nitrógeno, se utilizan suelos como fuente del inóculo, posteriormente, en el laboratorio el aislamiento se obtiene con un medio de cultivo libre

de nitrógeno como: agar Ashby, agar levadura manitol, agar rojo congo, agar mineral sin nitrógeno, agar Ashby benzoato o Ashby sacarosa (Escobar et al., 2011). Finalmente, en la identificación preliminar se utilizan las técnicas como la tinción de Gram y técnica de azul de bromotimol (Flores-Gallegos et al., 2012)

#### **4.2 Estado del Arte**

Los procesos biológicos del suelo son determinantes en la fertilidad. En los sistemas de producción agrícola, la estrategia para elevar los rendimientos de los cultivos se ha basado en la aplicación de diferentes fertilizantes y pesticidas químicos, sin evaluar el efecto en el cambio de las propiedades fisicoquímicas y las poblaciones de microorganismos del suelo (Font et al., 2002). Teniendo en cuenta esta problemática, se han desarrollado diferentes investigaciones que buscan determinar las poblaciones de microorganismos en suelos de producción agrícola. Algunos estudios relacionan el análisis y conteo de bacterias fijadoras de nitrógeno en suelos de acuerdo al modelo de producción implementado.

Flores-Gallegos et al., (2012) explican que la mayoría de los cultivos necesitan y dependen de fertilizantes químicos sintéticos los cuales proporcionan nutrimentos asimilables por las plantas. De igual manera, el uso prolongado de estos fertilizantes ocasionan contaminación ambiental y daños ecológicos, además de incremento en el costo de producción y el impacto negativo en la salud animal y humana. Font et al., (2002) evaluaron índices de la actividad respiratoria, celulolítica y la capacidad nitrificadora en el suelo y en cultivos de cítricos sometidos durante 10 años a diferentes dosis de nitrógeno, fósforo y potasio. Los resultados indicaron que dosis de nitrógeno mayores a  $100 \text{ kg ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$  puede estar asociado con la disminución de los

microorganismos como consecuencia de elevadas aplicaciones del fertilizante; por el contrario, la adición de fósforo ( $150 \text{ kg ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ ) y potasio ( $120 \text{ kg ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ ) generan mayor capacidad en los microorganismos en llevar a cabo la mineralización de los restos orgánicos favoreciendo el rendimiento de los cultivos.

Desde hace muchos años se ha evaluado la actividad fijadora de nitrógeno de microorganismos inoculando suelos y evaluando la capacidad de acumulación de nitrógeno en el suelo como una alternativa de biofertilizantes en la agricultura. Diferentes ensayos en campo han demostrado el efecto positivo de *Azotobacter* spp. en el rendimiento de cultivos como maíz, trigo y arroz; de igual manera, *Azospirillum* spp. en cultivos de trigo, canola y maíz (Rubio, 2003). Adicionalmente, Kennedy et al., (2004) reportaron que es posible reducir la fertilización nitrogenada hasta un 50% inoculando el suelo con estos microorganismos. De igual manera, Flores-Gallegos et al., (2012) indican que se pueden utilizar biofertilizantes para promover una agricultura orgánica y tecnologías limpias, donde se usen bacterias fijadoras de nitrógeno (diazotrofas) de las cuales las mas utilizadas para el rendimiento de estos procesos son las bacterias del género *Azotobacter*.

Escobar et al., (2011) en la investigación de caracterización de cepas nativas de *Azotobacter* y su efecto en el desarrollo del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) plantean que el aumento de la productividad es importante para la rentabilidad de los cultivos siendo necesaria la aplicación de nitrógeno, fósforo y potasio, para asegurar el rendimiento adecuado. No obstante, al agregar estos fertilizantes al suelo, también se afecta la microfauna presente en este donde se da una disminucion de la actividad microbiana comprometida con la nutrición vegetal, debido a que las bacterias fijadoras de nitrógeno que se encuentran en el suelo del cultivo, no fijan el nitrógeno del suelo sino que sólo fijan el nitrógeno proporcionado por el fertilizante, de esta manera, no se

presenta FBN (Silvia et al., 2009). Contrario a esto, en los sistemas de producción sostenible, la dinámica de los agroecosistemas depende completamente de un grupo de microorganismos que tienen la habilidad de reducir el nitrógeno atmosférico en diferentes formas químicas, las cuales pueden ser utilizadas por las plantas e incluso por estos microorganismos para suplir total o parcialmente los requerimientos de síntesis de proteínas (Pérez et al., 2010). Por otra parte, *Azotobacter* además de su empleo como rizobacterias promotoras del crecimiento (PGPR), ha tenido otras aplicaciones de importancia biotecnológica, tales como la producción de surfactantes, que son elementos que permiten humectar y reducir la tensión superficial que existe en un fluido (Thavasi et al., 2009), producción de alginatos, que son polisacáridos microbianos con capacidad de influir sobre sus propiedades, mediante el control de las condiciones en el medio de cultivo (Khanafari & Sepahei, 2007) y bioplásticos como alternativa a los plásticos derivados del petróleo (Khanafari et al., 2006).

Teniendo en cuenta la importancia agronómica de las bacterias fijadoras de nitrógeno Jiménez et al., (2011) aislaron y caracterizaron BFN compatibles con el género *Azotobacter* y su utilidad como inoculantes en cultivos de *Dendranthema grandiflora* (crisantemo), *Stevia rebaudiana* (estevia), algodón (*Gossypium* spp.) y vegetales (papa, brócoli, zanahoria, tomate) en muestras de suelo que fueron colectadas al azar en cultivos en diferentes zonas de Boyacá (Colombia). Se reportó que los suelos con rangos de pH 6.25-7.44 fueron óptimos para el crecimiento de las especies de *Azotobacter* en los cultivos de papa, brocoli, zucchini, espinaca, coliflor, zanahoria y tomate.

En Sincelejo, departamento de Sucre (Colombia), Pérez et al., (2010) encontraron que en la region Caribe la calidad de los suelos presenta déficit debido a la estacionalidad de las lluvias, lo

que produce escasez de forraje durante la época seca, problema originado por las características de los suelos: alto grado de compactación, erosión y niveles bajos de fertilidad; donde es más difícil que se desarrollen cultivos sin la ayuda de fertilizantes. Una práctica común para incrementar el rendimiento de los cultivos en esta zona del país es la utilización de insumos químicos, los cuales proporcionan los macro y micronutrientes necesarios, concluyendo que el uso de dosis elevadas de estos fertilizantes, puede tener efectos negativos en el medio ambiente y contribuye a la contaminación del suelo, el agua y áreas naturales. Adicionalmente, Cuadrado et al., (2009) analizaron la diversidad de las cepas de rizobios (*Rhizobium* spp. y *Bradyrhizobium* spp.) con habilidad de nodulación aisladas del frijol *Vigna unguiculata* (frijol caupí), cultivado en el norte del departamento de Bolívar (Colombia). De acuerdo con las características morfológicas, requerimientos metabólicos, resistencia a metales y antibióticos, y las características y requerimientos del cultivo; se identificaron 52 cepas de rizobios capaces de crecer en ambientes hostiles, las cuales tienen uso potencial como bioinoculantes.

Considerando la relación de los parámetros fisicoquímicos del suelo y la diversidad biológica, Sivila de Cary & Hevé (1994) evaluaron el estado microbiológico del suelo con periodos de descanso entre 1 a 30 años para determinar la fertilidad del suelo en el altiplano Boliviano, este se caracterizó por ser un ecosistema semiarido con cultivos de *Stipa ichu* (paja brava) y *Baccharis* spp. En el laboratorio, con medios de cultivos selectivos se evaluaron bacterias, hongos y actinomicetos encontrando que, en general muchas propiedades químicas y biológicas del suelo están influenciados por las propiedades físicas del mismo, demostrando que los microorganismos del suelo son responsables de transformaciones fisicoquímicas importantes para la producción agrícola. En cuanto a las poblaciones de bacterias Vélez et al., (2008)



reportaron poblaciones de entre  $10^6$  y  $10^8$  UFC/g de suelo de *Azotobacter* al realizar aislamientos de siembra por estría en placas con medio mineral sin nitrógeno. Las mayores poblaciones se encontraron en suelos con pH alcalino y textura franco-arenosos. Adicionalmente, Döbereiner & Pedrosa (1990) encontraron poblaciones de *Azospirillum* en un intervalo de  $10^5 - 10^7$  UFC/g de suelo, en plantas de pasto procedentes de regiones tropicales de África y del sur de América. Por otra parte, en el municipio de Tolú, departamento de Sucre (Colombia), los suelos se caracterizan por contener altos niveles de compactación, erosión y bajos niveles de fertilidad. Pérez et al., (2011) encontraron que la densidad de las bacterias osciló de  $3 \times 10^8$  a  $11 \times 10^8$  UFC/g de suelo para aislados compatibles con el género *Rhizobium*.

Mantilla et al., (2009) sustentan que varios estudios han demostrado la importancia y el efecto de la presencia de microorganismos en procesos agrícolas y el uso sostenible del suelo. Los ecosistemas que dependen estrictamente del reciclaje de materia orgánica en descomposición, en los suelos de la Amazonía, la fijación biológica puede ser significativa, debido a que los suelos amazónicos son clasificados como oxisoles y ultisoles, los cuales requieren de alternativas sostenibles de fertilización nitrogenada. Consentino & Constantini (2000) demostraron en su estudio que las variables biológicas son mejores que las variables químicas como indicadores de calidad del suelo, puesto que son más sensibles en la identificación de cambios en diferentes manejos de cultivos. Por ello, entre las metodologías desarrolladas, para la determinación de carbono orgánico se utiliza la biomasa microbiana contenida en el suelo, como medida indirecta de la cantidad de microorganismos existentes, lo que de igual forma permite conocer los cambios ocurridos en el ambiente edáfico.

En el municipio de Repelón, zona agrícola ubicada al sur del departamento del Atlántico, la información cualitativa y cuantitativa concerniente a la microflora del suelo es muy escasa y no

hay reportes de investigaciones realizados sobre este aspecto. Por lo anterior, es necesario un estudio que genere información sobre la salud del suelo representada en las propiedades fisicoquímicas y poblaciones de aislados bacterianos compatibles con las bacterias fijadoras de nitrógeno.

## 5. Diseño Metodológico

### 5.1 Área de Estudio

El presente estudio se realizó en los suelos agrícolas del Distrito de Riego de Repelón (DRR), el cual se encuentra localizado: 10° 29' N y 75° 08' O al sur del departamento del Atlántico (**Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). Esta zona se caracteriza por presentar temperaturas promedio de 28.2°C. La precipitación anual presenta variaciones, en el primer semestre del año (enero a junio) se presenta la época seca la cual se caracteriza por precipitaciones de 39 mm, y en el segundo semestre (agosto a diciembre) la época de lluvia en donde se presentan precipitaciones promedio de 117.2 mm (Climate, 2017). El IGAC (2008) clasifica los suelos del Distrito de Riego de Repelón de acuerdo con su textura como: franco arcillo arenosa y franco arcillo limosa a una profundidad de 30 cm, estos suelos pertenecen al orden inceptisoles, subgrupos *Fluventic Haplustepts* y *Typic Haplustepts*, respectivamente.

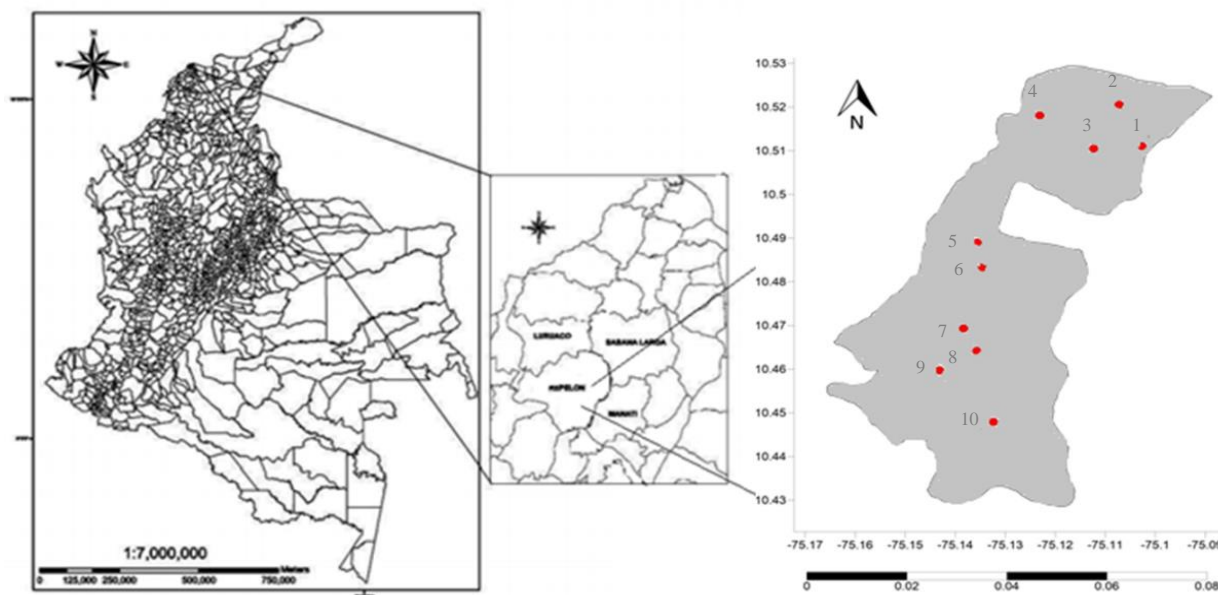


Figura 1. Ubicación general del Distrito de Riego de Repelón. Tomado y modificado de (Torres-Bejarano et al., 2014).

## 5.2 Fase de Campo

En el mes de junio de 2016, se seleccionaron 10 puntos al azar de norte a sur en suelos agrícolas del distrito de riego de Repelón, iniciando en la zona norte con desplazamiento a la zona sur. Cada punto de muestreo fue nombrado de acuerdo con las características generales de la zona. Se tomaron muestras de suelo compuestas, estas se recolectaron de acuerdo con los lineamientos del IGAC para métodos analíticos del laboratorio de suelos (IGAC, 2007).

Para la recolección de las muestras compuestas, en cada punto de muestreo se tomó como eje una planta y se establecieron tres puntos alrededor de esta a 1m aproximadamente. En cada extremo de estos se eliminó la cobertura vegetal y se cavó un hueco entre 15 – 20 cm de profundidad. Todo el suelo colectado en cada punto (3 submuestras) se mezcló para constituir la muestra compuesta (IGAC, 2007), estas se empacaron en bolsas Ziploc® y fueron transportadas al laboratorio en cavas de polietileno expandido, manteniendo una temperatura de  $2\pm 1^{\circ}\text{C}$  con gel pack el mismo día del muestreo. Las muestras se procesaron a lo largo de las 24 horas después de colectadas.

Por otra parte, se tuvo una conversación con los agricultores encargados de la zona estudiada donde se les preguntó sobre aspectos de las prácticas de producción de cultivos como las áreas plantadas, tipo de frecuencia de cultivo de plagas y uso de fertilizantes y plaguicidas (tipo de pesticida o fertilizante, las características y frecuencia de aplicación).

De acuerdo con la metodología de *Prácticas de Microbiología* (2010), para la siembra del inóculo se escogieron las diluciones ( $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$ ) empleándose medios de cultivos selectivos

libres de nitrógeno: agar levadura manitol, agar rojo congo y agar manitol Ashby (Anexo 1). Por cada dilución a evaluar se realizaron tres réplicas y dos controles: positivo y negativo, con el objetivo de descartar microorganismos contaminantes. El aislamiento de cada bacteria fijadora de nitrógeno consistió en tomar 50µL de la dilución de  $10^{-3}$  y depositarlo en el medio de cultivo selectivo, posterior a esto, con el asa de Henle previamente esterilizada se extendió la dilución por la técnica de estría cruzada. Este procedimiento se repitió para las diluciones de  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$ . Las cajas de petri fueron incubadas a 37°C durante 7 días (Pérez et al., 2011).

Transcurrido este tiempo, se realizó la confirmación de la bacteria fijadora de nitrógeno con la tinción de azul de bromotimol y tinción de Gram. En la tinción con azul de bromotimol el cambio a un color amarillo fue positivo para bacterias fijadoras de nitrógeno. Por otra parte, la tinción de Gram (Anexo 2) la coloración rosa correspondió a bacterias fijadoras de nitrógeno.

Posteriormente, con la dilución de  $10^{-5}$  se realizaron observaciones y descripción de las características macroscópicas: color, borde, elevación y textura. Adicionalmente, se determinó la densidad poblacional por medio del conteo de las Unidades Formadoras de Colonia (UFC/g de suelo), de acuerdo con la siguiente ecuación (1) (Ilyas, Bano, & Iqbal, 2008):

$$\text{UFC/g de suelo} = \frac{(\text{Número de colonias} * \text{factor de dilución})}{\text{volumen del inóculo}} \quad (1)$$

Teniendo en cuenta que la diversidad y cantidad de microorganismos varían entre los diferentes tipos de suelos de acuerdo con las características fisicoquímicas del medio edáfico, también se evaluaron sus propiedades en el laboratorio del Centro de Investigación en Tecnologías Ambientales (CITA) en la Universidad de la Costa.

### 5.3.2 Características Fisicoquímicas del Suelo.

**5.3.2.1. pH:** se analizó siguiendo el procedimiento planteado en la NTC 5264/08, en el cual se tomó la muestra de suelo y agua en una relación de 1:2 y se colocó en el agitador por diez minutos, posteriormente se determinó el pH con ayuda del equipo pHmetro (pH 100A YSI).

**5.3.2.2. Humedad:** en una capsula previamente secada al horno, se pesaron 50 g de suelo húmedo y se colocó en el horno durante 24 horas a 105°C. Posteriormente se calculó el peso de la muestra de suelo seco de acuerdo con la ecuación 2 (IGAC, 2007).

$$Pw(\%) = \frac{\text{peso suelo humedo} - \text{peso suelo seco}}{\text{peso suelo húmedo}} * 100 \quad (2)$$

**5.3.2.3. Carbono Orgánico:** con el método de Walkley-Black (IGAC, 2007), se pesaron 0.3 g de muestra, a la cual se adicionó 10 mL de  $K_2Cr_2O_7$  (dicromato de potasio) y 20 mL de  $H_2SO_4$  (ácido sulfúrico), se agitó por 1 minuto, y dejó en reposo 30 minutos. Posterior al tiempo de reposo, se adicionaron 200 mL de agua destilada, 10 mL de  $H_3PO_4$  (ácido fosfórico) y se procedió a la titulación con solución de sulfato ferroso amoniacal (FAS). Se valoró la solución FAS, adicionando el indicador hasta que se presentó viraje de naranja a verde. Se calculó el contenido de carbono orgánico de acuerdo con la ecuación 3 (IGAC, 2007).

$$C.O = (Vb - Vm) * N * 0.003 * 100 \quad (3)$$

En donde:

C.O. (%) = porcentaje del carbono orgánico total

V<sub>b</sub> = volumen (mL) de solución ferrosa gastado en el blanco

V<sub>m</sub> = volumen (mL) de solución ferrosa gastado en la muestra

N = normalidad de solución ferrosa (0.5)

Factor que representa el peso de 1 equivalente de Carbono en g por el 100% entre la eficiencia del 75%

**5.3.2.4. Materia Orgánica:** para el cálculo de materia orgánica una vez ya obtenido el valor de carbono orgánico se procedió a utilizar la ecuación 4 (IGAC, 2007).

$$M.O.(%) = C.O.(%) * 1.74 \quad (4)$$

En donde:

M.O. (%) = porcentaje de materia orgánica

C.O. (%) = porcentaje del carbono orgánico total

1.74 = Factor donde se considera la abundancia promedio de C en materia orgánica que es 58%, por lo que, el factor de conversión para expresar el %C es 100/58.

**5.3.2.5. Fósforo disponible:** El método de Olsen modificado se utilizó para la determinación del fósforo total en el suelo. Las muestras fueron evaluadas por un laboratorio acreditado por el IDEAM en Barranquilla.



### **5.3.3 Análisis de la Información**

La representación gráfica de las densidades de bacterias en los distintos puntos muestreados se realizó mediante el Software Golden Surfer 11. Adicionalmente, se realizó un análisis estadístico de correlación de Spearman para conocer el grado de asociación existente entre las propiedades fisicoquímicas del suelo con las UFC, empleando el software estadístico InfoStat (Di Rienzo et al., 2012).

## 6. Resultados

### **Descripción de los morfotipos de las bacterias fijadoras de nitrógeno presentes en suelos agrícolas del Distrito de Riego de Repelón, Atlántico.**

Se aislaron y caracterizaron tres cepas de bacterias fijadoras de nitrógeno. En el cultivo selectivo agar levadura manitol para las colonias aisladas de la cepa-1, se obtuvo que en los controles (positivo y negativo) no crecieron microorganismos (Figura 3;**Error! No se encuentra el origen de la referencia.**), garantizando que las bacterias aisladas correspondieron a las muestras de suelo.

Se observaron colonias con características similares (Figura 4). Las colonias presentaron color blanco hueso y una secreción viscosa en la caja petri. Por lo general, el 60% presentó forma circular o irregular, con bordes filamentosos, es decir, con aparentes hilos que se desprendían desde la parte central de la colonia, la gran mayoría de las colonias presentaron elevación y superficie lisa. En el momento en que empezaron a crecer las colonias, se presentó un cambio de color en el medio de cultivo debido al indicador de pH (rojo de fenol). Por otra parte, en la morfología celular bacteriana se observaron bacilos rectos con bordes redondeados.

La prueba de tinción de Gram, con coloración rosada indicó bacterias Gram negativas (Figura 5A) y la prueba de azul de bromotimol mostró coloración amarilla (Figura 5B), confirmando que los microorganismos aislados correspondieron bacterias fijadoras de nitrógeno.

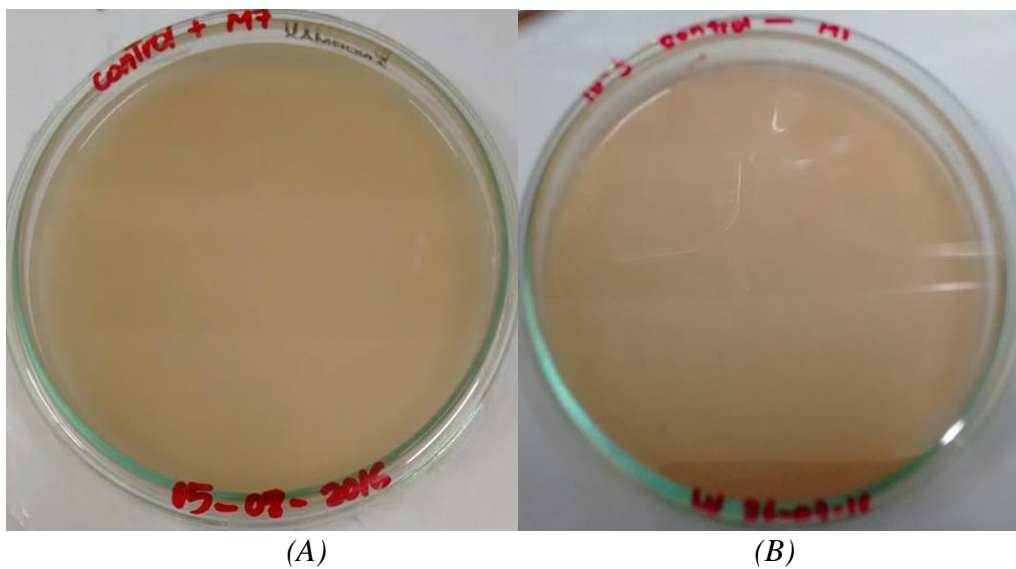


Figura 3. Controles para el aislamiento de las colonias de la cepa-1 en agar levadura manitol (A) Control positivo. (B) Control negativo.



Figura 4. Morfología de las colonias aisladas de la cepa-1 en la dilución 10-5 con el medio selectivo agar levadura manitol.

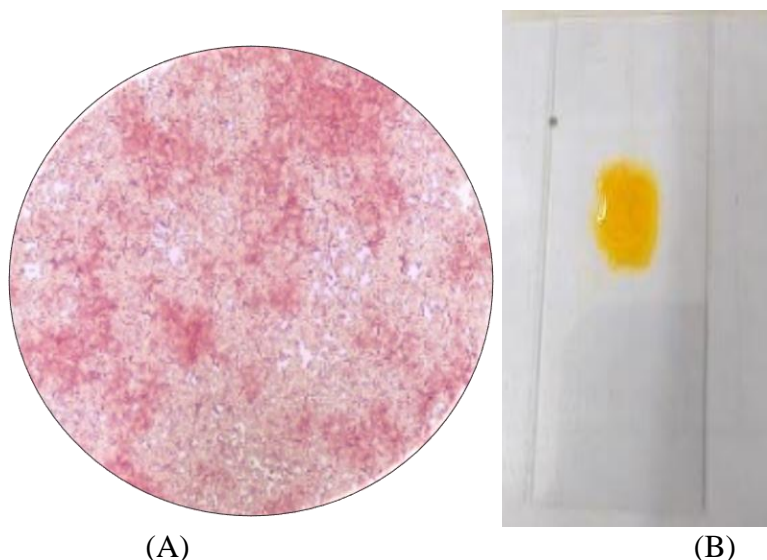


Figura 5. Pruebas para la confirmación de las bacterias fijadoras de nitrógeno para las colonias de la cepa-1: (A) Tinción de Gram. (B) Tinción con azul de bromotimol.

(A) En el cultivo selectivo agar manitol Ashby para las colonias aisladas de la cepa-2, se encontró que en los controles (positivo y negativo) no crecieron microorganismos (Figura 6

) garantizando que las bacterias aisladas correspondieron a las muestras de suelo.

Las colonias exhibieron coloración amarilla y variaciones en la forma (Figura 7). Los aislados compatibles se caracterizaron por presentar elevación convexa baja, a simple vista la colonia creció mucho más alta que los otros aislados. Se presentaron colonias lanceoladas (alargada con bordes enteros), al igual que colonias de forma irregular. Por otra parte, en la morfología celular bacteriana se observaron cocos.

La coloración rosa obtenida en la tinción de Gram (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**A) indicó bacterias Gram negativas y la coloración amarilla resultado de la prueba de azul de bromotimol (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**B) corroboran que los microorganismos aislados correspondieron a bacterias fijadoras de nitrógeno.

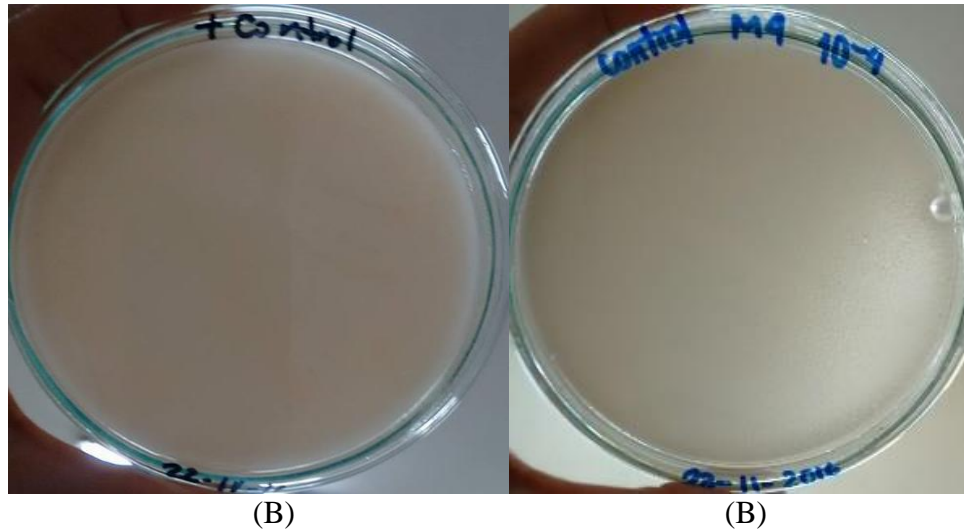


Figura 6. Controles para el aislamiento de las colonias de la cepa-2 en agar manitol Ashby: (A) Control positivo. (B) Control negativo.



Figura 7. Morfología de las colonias aisladas de la cepa-2 en la dilución  $10^{-5}$  con el medio selectivo agar manitol Ashby.

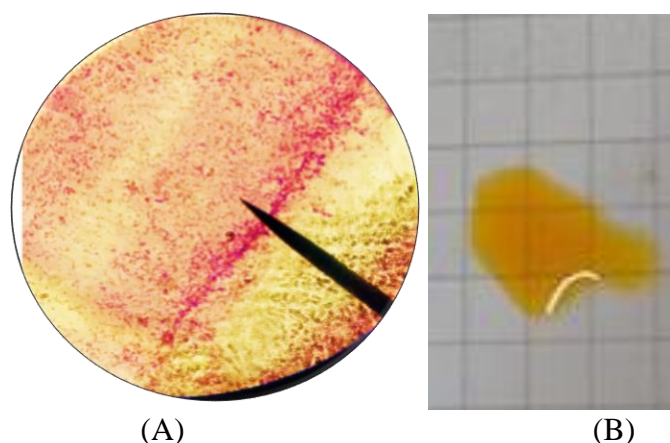


Figura 8. Pruebas para la confirmación de las bacterias fijadoras de nitrógeno para las colonias de la Cepa-2: (A) Tinción de Gram. (B) Tinción con azul de bromotimol.

En el cultivo selectivo agar rojo congo, para las colonias aisladas de la cepa-3, se observó que en los controles (positivo y negativo) no crecieron microorganismos (Figura 9. **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**) garantizando que las bacterias aisladas correspondieron a las muestras de suelo.

El 50% de las muestras exhibieron una forma de la colonia lanceolada, es decir alargada, un 20% una forma de la colonia filamentososa y el 30% restante forma irregular. Todas las muestras presentaron una elevación plana o aplastada, borde de la colonia entera o continúa y coloración rojo intenso (Figura 10). Por otra parte, en la morfología celular bacteriana se observaron bacilos y cocos.

La prueba de confirmación tinción de Gram (Figura 11A), de color rosado, indicó que las bacterias son Gram negativas y la coloración amarilla resultado de la prueba de azul de

bromotimol, indicó un color amarillo (Figura 11B); reflejando que los microorganismos aislados corresponden a bacterias fijadoras de nitrógeno.

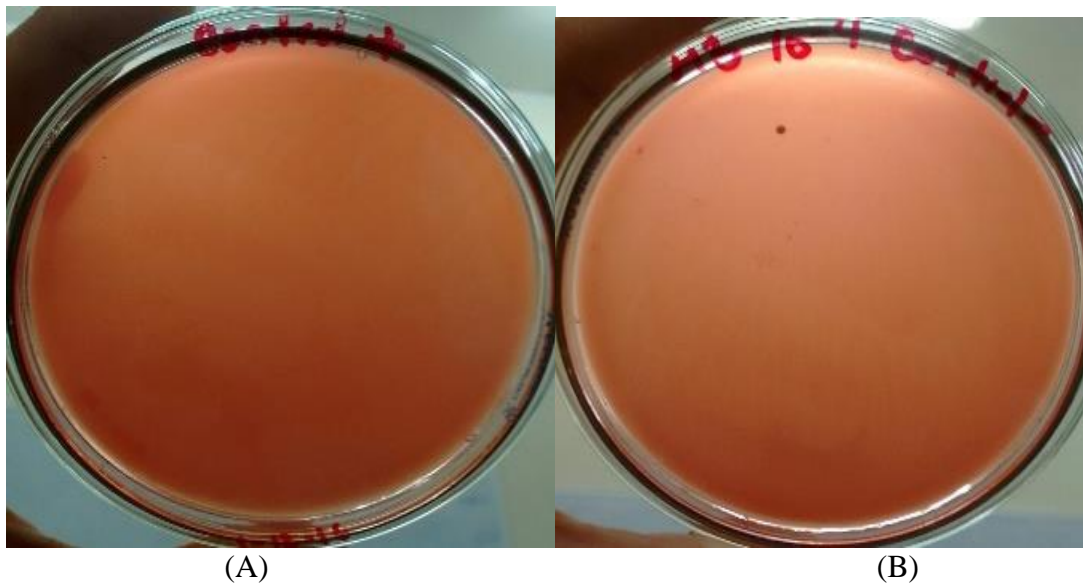


Figura 9. Controles para el aislamiento de las colonias de la cepa-3 en agar rojo congo: (A) Control positivo. (B) Control negativo.

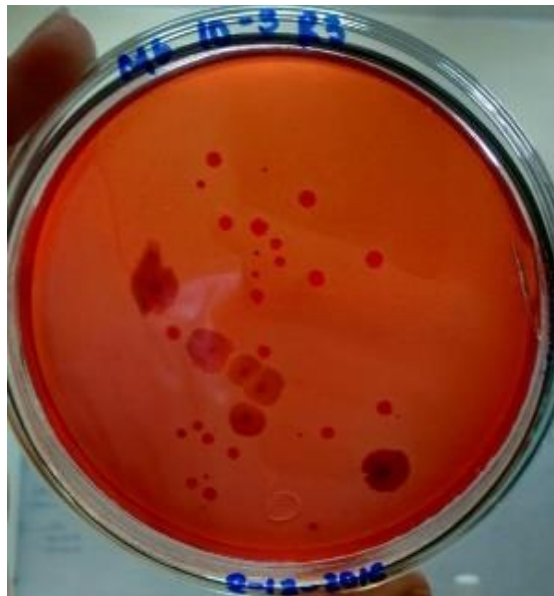


Figura 10. Morfología de las colonias aisladas de la cepa-3 en la dilución  $10^{-5}$  con el medio selectivo agar rojo congo.

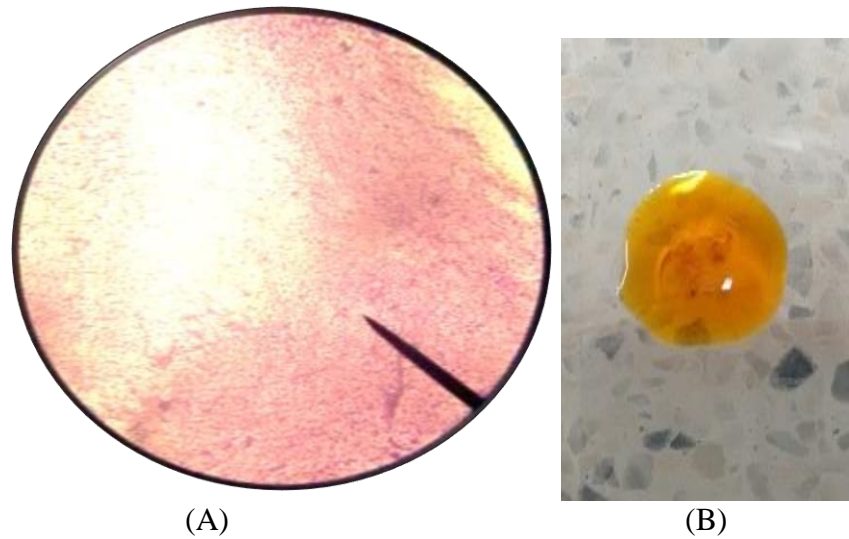


Figura 11. Pruebas para la confirmación de las bacterias fijadoras de nitrógeno para las colonias de la Cepa-3: (A) Tinción de Gram. (B) Tinción con azul de bromotimol.



**Estimación de la densidad poblacional de bacterias fijadoras de nitrógeno presentes en los suelos agrícolas del distrito de riego de Repelón, Atlántico.**

La densidad poblacional de la cepa-1 presentó variaciones en los diferentes puntos muestreados (Figura 12; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). En la zona norte (punto 2) se encontraron en promedio  $4.4 \times 10^7$  UFC/g de suelo siendo la zona con mayor presencia de bacterias. Por el contrario, la menor densidad poblacional se encontró en la zona sur (puntos 9 y 10) con  $9.3 \times 10^6$  y  $1.2 \times 10^7$  UFC/g de suelo, respectivamente.

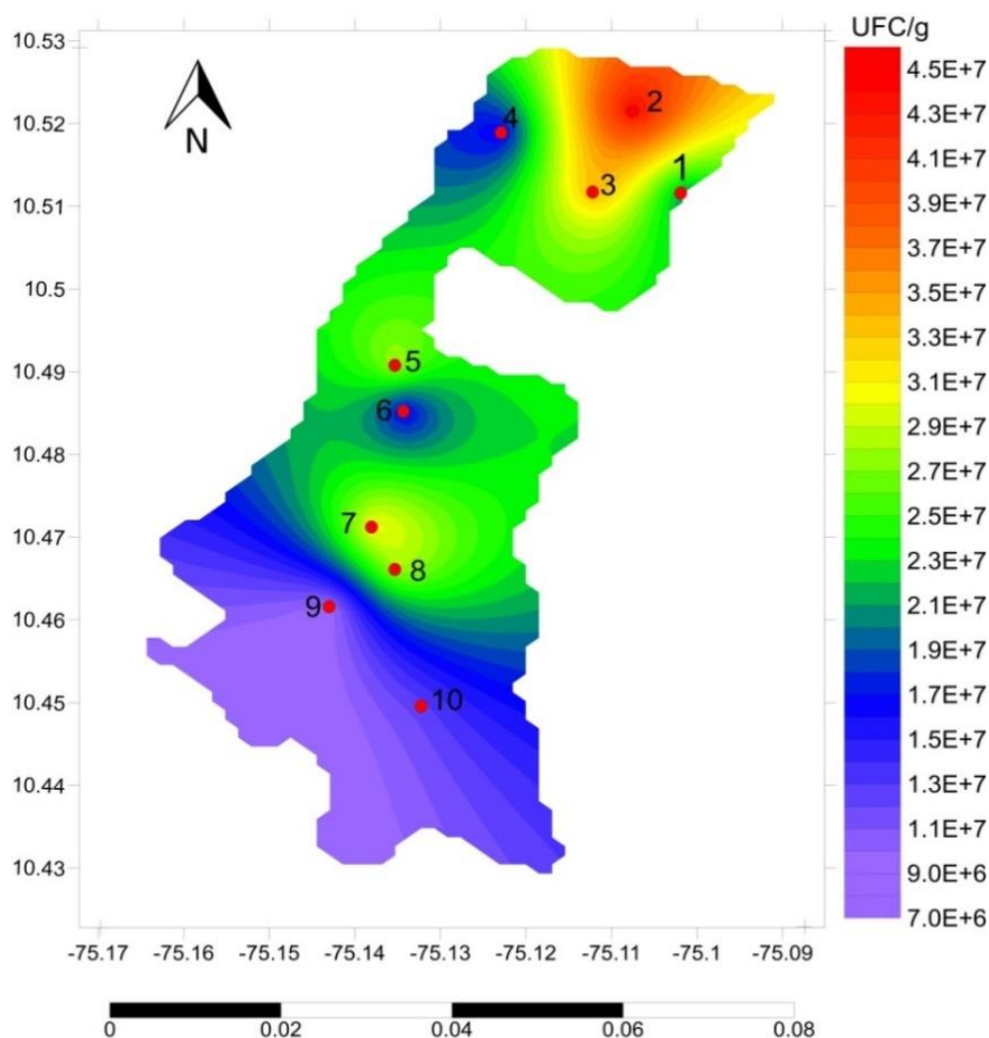


Figura 12. Densidad poblacional de las colonias aisladas de la cepa-1 en la dilución 10-5 en distrito de riego de Repelón, Atlántico.

Las colonias aisladas de la cepa-2 variaron en la densidad poblacional en los diferentes puntos muestreados (Figura 13). En la zona centro se encontró mayor presencia de estas bacterias, el punto 8 con una densidad de  $5.2 \times 10^7$  UFC/g de suelo. Mientras que los valores más bajos se encontraron en la zona sur (puntos 9 y 10) con  $1.75 \times 10^7$  UFC/g de suelo en promedio y en la zona norte (puntos 1 y 4) se encontraron  $6.65 \times 10^6$  UFC/g de suelo de población en promedio.

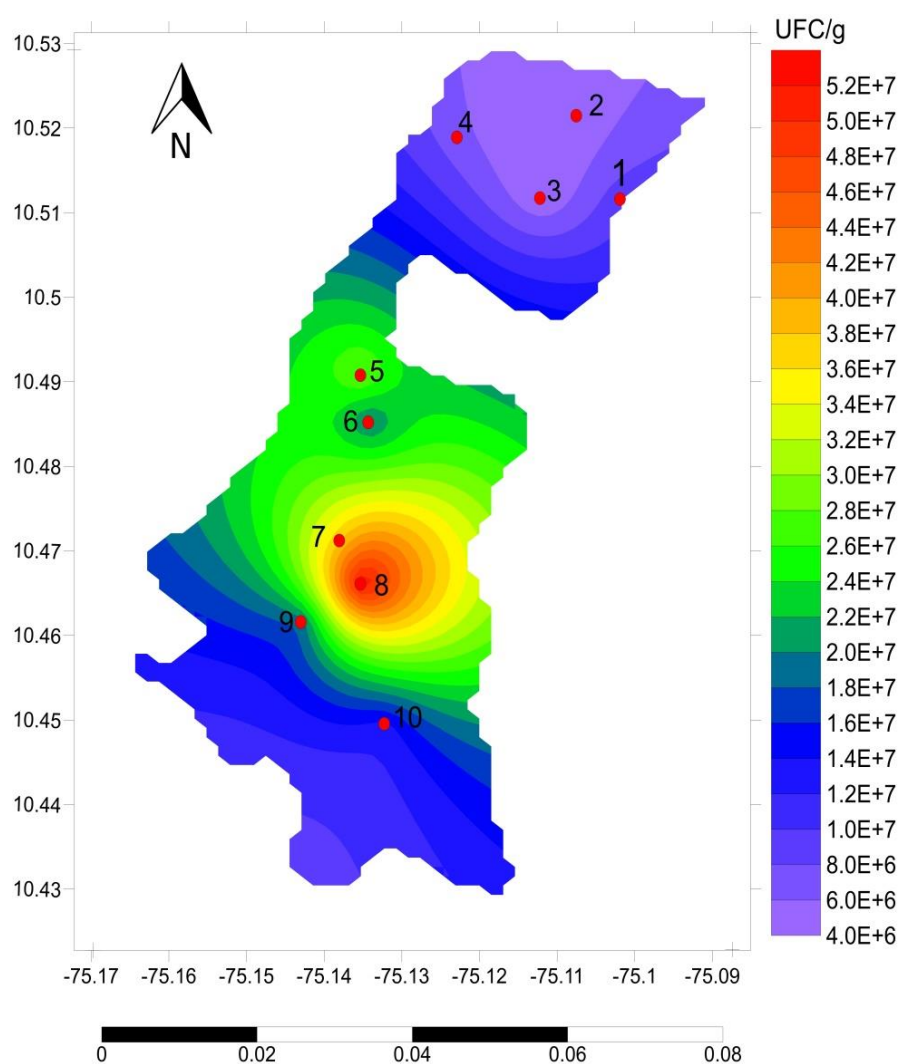


Figura 13. Densidad poblacional de las colonias aisladas de la cepa-2 en la dilución 10-5 en distrito de riego de Repelón, Atlántico.

La densidad poblacional de las colonias aisladas de la cepa-3, variaron en los diferentes puntos muestreados (Figura 14). En la zona norte (punto 3) el valor más elevado con  $1.6 \times 10^8$  UFC/g de suelo y en las zonas centro (puntos 6 y 7) en promedio  $4.6 \times 10^7$  UFC/g de suelo y en la zona sur (puntos 8 y 10) se presentó menor densidad con promedio de  $1.6 \times 10^7$  UFC/g de suelo.

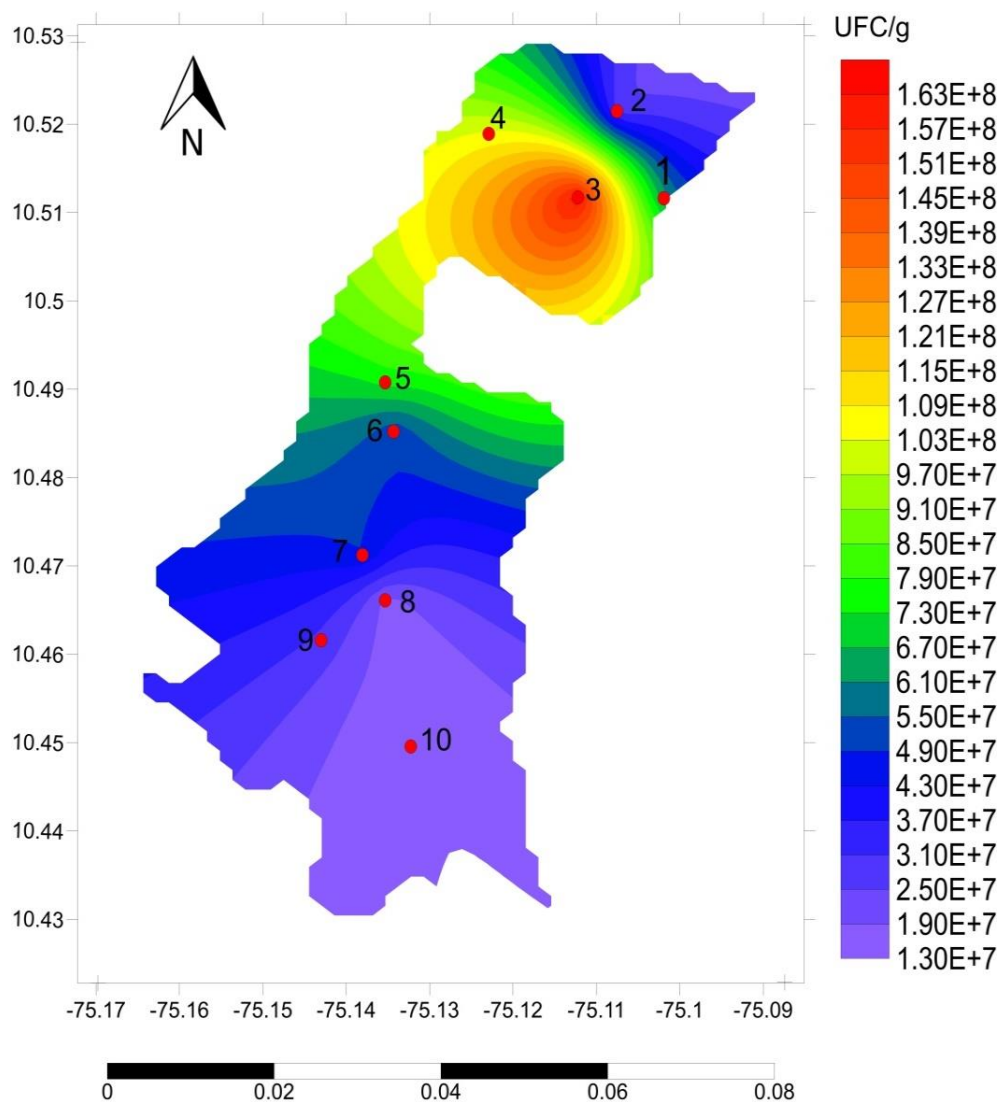


Figura 14. Densidad poblacional de las colonias aisladas de la cepa-3 en la dilución  $10^{-5}$  en distrito de riego de Repelón, Atlántico.

En general, se observó en la zona norte mayor población de las cepas 1 y 3. Por el contrario, la cepa 2 exhibió mayor densidad poblacional en la zona centro del Distrito de Riego de Repelón.

**Establecimiento de la relación existente entre los parámetros fisicoquímicos del suelo y la densidad poblacional de bacterias fijadoras de nitrógeno presentes en los suelos agrícolas del distrito de riego de Repelón, Atlántico.**

La Tabla 1 expone las características de los usos del suelo de las zonas muestreadas. En la zona de estudio, se encontraron diferentes cultivos, vivero con árboles de silvicultura de neem (*Azadirachta indica*) y cultivos anuales (plátano, maíz, yuca y frijol). Adicionalmente, los sitios de muestreo sin actividad agrícola fueron catalogados como área de descanso con cubierta vegetal (hierba). Sólo en un lugar, el suelo estaba en preparación para cultivar.

Aunque los agricultores dependen del suministro de agua de riego para el desarrollo de los cultivos, durante la época de muestreo el distrito de riego no se encontraba en funcionamiento. Por otra parte, las informaciones recopiladas de las conversaciones confirmaron el uso de productos químicos como Lorsban<sup>TM</sup> 4E (insecticida), glifosato (herbicida) y NPK 15-15-15 (fertilizante Triple 15) cuando la actividad agrícola está activa. No obstante, en el momento de muestreo, estos no fueron aplicados debido a que las áreas con los cultivos eran pequeñas (aproximadamente de 25m<sup>2</sup>). Los agricultores comunicaron que, en la época seca la actividad agrícola es baja, y tienen pequeñas áreas plantadas debido a que, como dicho anteriormente, el distrito de riego no funciona. En este contexto, es posible realizar control manual de plagas y las actividades de fertilización son escasas ya que los cultivos son para sí mismos y no para la comercialización.

Tabla 1.

*Descripción del suelo utilizado durante la estación seca en el distrito de riego de Repelón.*

Punto de Muestreo	Tipos de Plantaciones				
	Árboles de silvicultura	Árboles frutales	Cultivos anuales	Área de descanso	Suelo Preparado
1. Área de descanso	+	-	-	+	-
2. Área de descanso	-	-	-	+	-
3. Área de descanso	-	-	-	+	-
4. Cultivos anuales	-	-	+	-	-
5. Cultivos anuales	-	-	+	-	-
6. Cultivos anuales	-	-	+	-	-
7. Área de descanso	-	-	-	-	+
8. Cultivos anuales	-	-	+	-	-
9. Área de descanso	-	+	-	+	-
10. Área de descanso	-	-	-	+	-

*Nota:* Tipo de plantaciones + Presente y – Ausente, en los puntos de muestreos del estudio.

Las propiedades fisicoquímicas de los puntos muestreados se presentan en la Tabla 2. El suelo del distrito de Riego de Repelón se caracterizó por presentar variaciones de pH entre ligeramente ácido con valores que oscilan entre 6.41 y 6.56 en los puntos 10 y 7, respectivamente; adicionalmente, puntos con pH ligeramente básico, con valores entre 7.20 y 7.26 en los puntos 5, 8 y 1. La humedad de las muestras de suelo mostró valores bajos, donde el punto 7 presentó el porcentaje más bajo de humedad (0.92%) y, por el contrario, el punto 8 presentó el mayor porcentaje de humedad (5.99%), valores asociados con la época seca. El

carbono orgánico y la materia orgánica del suelo exhibieron variaciones en todos los puntos muestreados. En el punto 1 se reportó el porcentaje de carbono más bajo (1.67%) al igual que la materia orgánica (2.91%). Por el contrario, el punto 8 presentó el mayor porcentaje de carbono (3.71%) y materia orgánica (6.45%). En general, el fósforo total del suelo exhibió valores altos, siendo el punto 6 el valor mayor con 113 ppm y el punto 1 el menor valor con 76.2 ppm.

Tabla 2.

*Propiedades fisicoquímicas del suelo en los diferentes puntos de muestreo.*

Muestra	pH	Humedad (%)	COT (%)	MO (%)	Fósforo total (ppm)
1. Área de descanso	7.26	4.26	1.67	2.91	76.20
2. Área de descanso	6.81	3.96	2.99	5.20	90.60
3. Área de descanso	6.97	5.78	2.33	4.05	94.40
4. Cultivos anuales	7.23	3.71	3.45	6.00	98.50
5. Cultivos anuales	7.20	1.49	3.22	5.61	101.60
6. Cultivos anuales	7.23	4.81	3.43	5.97	113.00
7. Área de descanso	6.56	0.92	1.97	3.42	106.30
8. Cultivos anuales	7.20	5.99	3.71	6.46	108.20
9. Área de descanso	6.45	2.43	2.20	3.83	102.80
10. Área de descanso	6.41	5.61	2.06	3.58	111.30

COT: carbono orgánico total; MO: materia orgánica.

*Nota:* Resultados obtenidos de los parámetros fisicoquímicos evaluados en los puntos de muestreo.

La Tabla 3. expone la correlación entre las colonias aisladas de la cepa-1 y propiedades

fisicoquímicas del suelo. No se observó correlación entre las UFC y los parámetros del suelo.

Tabla 3.

*Correlación de las UFC aisladas de la cepa-1 y propiedades fisicoquímicas del suelo del Distrito de riego de Repelón, Atlántico.*

		UFC	pH	Humedad	COT	MO	Fósforo total
P – valor							
UFC		<b>1.00</b>	0.87	0.94	0.91	0.90	0.19
Ph		0.05	<b>1.00</b>	0.75	0.32	0.32	0.35
Humedad		0.02	0.12	<b>1.00</b>	0.41	0.41	0.62
COT		0.04	0.35	0.27	<b>1.00</b>	<b>0.00</b>	0.43
MO		0.04	0.35	0.27	1.00	<b>1.00</b>	0.43
Fósforo	r – valor	-0.45	-0.33	0.16	0.26	0.26	<b>1.00</b>

COT: Carbono orgánico total; MO: materia orgánica.

*Nota:* Resultados obtenidos de la correlación existente entre los parámetros fisicoquímicos del suelo con la densidad poblacional arrojada por la cepa-1.

La correlación entre las colonias aisladas de la cepa-2 y propiedades fisicoquímicas del suelo (Tabla 4) mostró significancia ( $P \leq 0.05$ ) con el fósforo total. Con los otros parámetros edáficos no se encontró correlación.



Tabla 4.

*Correlación de las UFC aisladas de la cepa-2 y propiedades fisicoquímicas del suelo del Distrito de riego de Repelón, Atlántico.*

		UFC	pH	Humedad	COT	MO	Fósforo total
P – valor							
UFC		<b>1.00</b>	0.85	0.60	0.62	0.62	0.03*
Ph		-0.06	<b>1.00</b>	0.71	0.33	0.33	0.41
Humedad		-0.18	0.13	<b>1.00</b>	0.41	0.41	0.62
COT		0.17	0.35	0.27	<b>1.00</b>	0.00	0.33
MO		0.17	0.35	0.27	1.00	<b>1.00</b>	0.43
Fósforo	r - valor	0.66	-0.29	0.16	0.26	0.26	<b>1.00</b>

\*Diferencia estadísticamente significativa  $P \leq 0.05$ . COT: Carbono orgánico total; MO: materia orgánica.

*Nota:* Resultados obtenidos de la correlación existente entre los parámetros fisicoquímicos del suelo con la densidad poblacional arrojada por la cepa-2.

La Tabla 5 muestra la correlación entre las colonias aisladas de la cepa-3 y propiedades fisicoquímicas del suelo. No hubo significancia estadística entre las variables evaluadas.

Tabla 5.

*Correlación de las UFC aisladas de la cepa-3 y propiedades fisicoquímicas del suelo del Distrito de riego de Repelón, Atlántico.*

		UFC	pH	Humedad	COT	MO	Fósforo total
P – valor							
UFC		<b>1.00</b>	0.08	0.57	0.82	0.82	0.16
Ph		0.57	<b>1.00</b>	0.71	0.33	0.33	0.41
Humedad		-0.20	0.13	<b>1.00</b>	0.41	0.41	0.62
COT		0.07	0.35	0.27	<b>1.00</b>	0.00	0.43
MO		0.07	0.35	0.27	1.00	<b>1.00</b>	0.43
Fósforo	r - valor	-0.47	-0.29	0.16	0.26	0.26	<b>1.00</b>

COT: Carbono orgánico total; MO: materia orgánica.

*Nota:* Resultados obtenidos de la correlación existente entre los parámetros fisicoquímicos del suelo con la densidad poblacional arrojada por la cepa-3.

**Alternativas de productividad agrícola sostenible que permiten garantizar el establecimiento y el mantenimiento de las bacterias fijadoras de nitrógeno presentes en los suelos agrícolas del distrito de riego de Repelón, Atlántico.**

El conocer la presencia o ausencia de las bacterias fijadoras de nitrógeno en el Distrito de Riego de Repelón, es de gran importancia puesto que estos microorganismos participan en los diferentes ciclos biogeoquímicos en el suelo e interactúan con las plantas promoviendo el crecimiento vegetal por medio de la asimilación biológica de nitrógeno. Además, ofrecen protección contra agentes nocivos suprimiendo patógenos, ayudan a remover contaminantes y solubilizan fosfato. Este conjunto de propiedades contribuye a aumentar la productividad del ecosistema (Ibarra-Sánchez, 2012; Pérez et al., 2010).

La densidad poblacional de bacterias edáficas es altamente variable, depende de la especie de bacteria, del estado de desarrollo de la planta y las condiciones ambientales como la temporada, el tipo de suelo, la vegetación, el contenido de humedad, el tipo de labranza y fertilización (Killian et al., 2001), lo que influye proporcionalmente en las características fisicoquímicas del suelo (Pérez et al., 2010).

Teniendo en cuenta los beneficios que ofrecen las bacterias fijadoras de nitrógeno es necesario desarrollar prácticas agrícolas sostenibles que conserven el suelo, el agua, los recursos genéticos animales y vegetales. Las prácticas para la conservación de los recursos se enfocan en ser ambientalmente no degradantes, técnicamente apropiadas, económicamente viables y socialmente aceptables. Estas prácticas no sólo buscan garantizar la seguridad alimentaria, también son pensadas en mejorar la calidad de vida de los trabajadores del campo. Permiten generar productos de forma saludable para los consumidores, sin comprometer la continuidad a

largo plazo, tanto de la propia actividad como de los procesos naturales que la sustentan y sin poner en riesgo la diversidad biológica de los sistemas donde se produce (Fundación Banco Santander, 2007).

La finalidad de implementar alternativas amigables con el medio ambiente es minimizar la degradación en suelos, incrementar el flujo de nutrientes (nitrógeno, fósforo y carbono) y mejorar las propiedades fisicoquímicas del suelo. De esta manera, se busca aumentar las poblaciones de microorganismos nativos para optimizar los procesos de transformación de materia orgánica que mejoran las propiedades del suelo y finalmente al ser aprovechada por los cultivos maximizan la producción, reflejado en el incremento del rendimiento de los cultivos (FAO, s.f.). Por consiguiente, la productividad agrícola es sostenible cuando se da un manejo adecuado al suelo, a los cultivos, al recurso hídrico, y de igual forma, se conserva la biodiversidad (FAO, 2002).

Es importante conocer que para contrarrestar o permitir alternativas de índole antropogénico, todo sistema natural se caracteriza por presentar una capacidad de resiliencia, esta permite que, a pesar de una perturbación, el sistema natural puede retornar a su estado original, es decir, puede superarlo y restaurarse (Sánchez-Zamora et al., 2016). Pero esta capacidad de resiliencia tarda años, por lo cual es importante establecer alternativas de producción agrícola las cuales permitan garantizar el mantenimiento de las bacterias fijadoras de nitrógeno, que ayuden a minimizar impactos negativos causados por actividades antropogénicas como el uso excesivo de fertilizantes y pesticidas para el manejo del cultivo y, la sobreexplotación de los suelos que a largo plazo conllevan a la desertificación.

Una buena opción de partida para las alternativas de productividad agrícola sostenible es

reducir la utilización de insumos químicos como plaguicidas y/o fertilizantes, debido a que el uso inadecuado y prolongado de estos, puede contribuir a una posible bioacumulación de metales pesados, y su comportamiento puede ser perjudicial, aportando como consecuencia una posible contaminación (Méndez et al., 2009). Así mismo, también puede aumentar las concentraciones de fósforo y carbono orgánico, como estos son conocidos por ser elementos lentos, no se requiere de elevadas concentraciones (Villar & Rodríguez, 2014). Igualmente, otra elección de productividad agrícola sostenible es la adopción de tecnologías limpias, sostenibles y económicas, como la preparación de compostas y lombricompostas que puedan ser utilizadas como abonos o enmiendas para incrementar el contenido de materia orgánica y mejorar propiedades físicas y químicas del suelo como la porosidad, humedad e incrementar el contenido de fósforo y materia orgánica (Pérez et al., 2010). Con la implementación de estos abonos en el suelo, se permite llegar a una zona muy importante llamada rizósfera, conocida por ser una zona de amortiguación microbiológica (Vélez et al., 2008), en la cual se busca complementar la fijación biológica de nitrógeno, puesto que esta característica es importante para la transformación de amonio y nitrato, compuestos que pueden ser asimilados por las plantas. Así mismo, un reto biotecnológico como sustituto parcial de fertilizantes nitrogenados (Vallejo et al., 2008), reduciendo o evitando la contaminación debido a sustancias tóxicas y/o metales contenidos en los fertilizantes y productos fitosanitarios, y a la emisión de gases (Fundación Banco Santander, 2007).

Otra opción como buena práctica para la conservación de suelos es disminuir el riesgo de erosión y de degradación física del suelo, esto es posible adoptando técnicas o actividades de manejo conservacionista que se ejecutan para evitar la pérdida del suelo (Carrasco & Riquelme, 2003). Estas prácticas incluyen la rotación de cultivos, el establecimiento de cultivos de

cobertura, policultivos y reducir el arado mecánico del suelo. De igual manera, se obtienen beneficios en la conservación de la capacidad de retención de agua, cierre de ciclos biogeoquímicos y el mantenimiento de la fertilidad en el tiempo (Fundación Banco Santander, 2007).

## 7. Discusión

Numerosos estudios muestran que los microorganismos del suelo intervienen en el aprovechamiento de nutrientes por parte de la planta (Estermann & McLaren, 1961; Alexander, 1980; Gianinazzi & Azcon, 1991; Cardoso et al., 1992). La presencia de los microorganismos fijadores de nitrógeno en el suelo permite que este mantenga un constante intercambio de nutrientes y minerales, los cuales degradan compuestos tóxicos e impulsan el equilibrio ecológico en los agroecosistemas, evitando también la pérdida de fertilidad en los suelos (Philippot & Germon, 2005; Jimenez et al., 2011). Adicionalmente, dependiendo del género y las poblaciones de los microorganismos edáficos, es posible entender la dinámica del sistema edáfico, lo que podría determinar las características desde su superficie hasta los distintos horizontes y la capacidad de uso de ese suelo (Villar & Rodríguez 2014).

Aunque la morfología de una colonia bacteriana no es suficiente para diferenciar entre especies o hacer un análisis de diversidad más exhaustivo, ofrece una idea del aislamiento (Mantilla et al., 2009). En esta investigación las tres cepas de las bacterias aisladas se pudieron corroborar por medio de la prueba tinción con azul de bromotimol y tinción de Gram, como indicativo de fijadoras de nitrógeno (Caballero, 2002). Las cepas aisladas presentaron morfología celular bacteriana similar a la descrita por Rubio (2003), quien encontró bacilos rectos y cocos Gram negativos, grandes y cortos. Rueda et al., (2016) encontró que el género *Azotobacter* macroscópicamente se caracteriza por presentar colonias de color crema, bacilos Gram negativos, grandes y cortos. Entre las condiciones edáficas para el establecimiento del género *Azotobacter*, el pH tiene una gran influencia sobre la distribución de estos microorganismos. Suelen ser poblaciones con pH mayor a 6.5, mientras que en pH inferiores es casi imposible

encontrar este tipo de bacterias (Rubio, 2003). Los aislamientos de la cepa-2 presentaron características similares, posiblemente relacionadas con este género. Pérez y Casas (2005) reportaron que el género *Azospirillum* presentó características de colonias con morfología plana, brillante, color rojo con bordes circulares y regulares.

Las bacterias del género *Azospirillum* generalmente se encuentran en la rizósfera de gramíneas, particularmente en cultivos como maíz, trigo y arroz (Gómez et al., 2014). La cepa-3 coincidió macroscópicamente al igual que los requerimientos edáficos. Por otra parte, Cuadrado et al., (2009) para el género *Rhizobium* reportó colonias gomosas, muy suaves y acuosas, translúcidas y blancas, similares a los aislamientos de la cepa-1. La literatura sobre suelos y condiciones ambientales similares en la región del Caribe colombiano podría sugerir que las cepas aisladas son compatibles con los encontrados en esta evaluación. Castellanos et al., (2010) en Codazzi, Departamento del César, caracterizó bacterias diazotróficas asimbióticas asociadas con el eucalipto (*Eucalyptus* spp.); se encontró que la diversidad poblacional, entre estos géneros compatibles con *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Burkholderia*, *Gluconacetobacter*, *Azotobacter*, *Beijerinckia* y *Derxia*, mostró densidad de población homogénea al comparar tiempos de lluvia y sequía. Aunque las cepas de bacterias fijadoras de nitrógeno coinciden con las descripciones reportadas en la literatura, los aislados bacterianos en esta investigación, posiblemente son compatibles con estos géneros. No obstante, es necesario realizar un análisis genético para poder determinar con exactitud la identificación taxonómica.

Teniendo en cuenta que las variaciones de factores bióticos o abióticos influyen en la calidad del suelo, la diferencia en las densidades de los microorganismos edáficos podría deberse



a la variabilidad de los resultados para los parámetros de pH (ligeramente ácido a ligeramente básico) y materia orgánica obtenidos en el análisis de los parámetros fisicoquímicos del suelo. Cambios en el pH del suelo, puede activar o inactivar las enzimas de los microorganismos. Así mismo, el pH actúa sobre la fijación de minerales nutritivos, influyendo directamente en el crecimiento y presencia de microorganismos, al igual que en el desarrollo de los cultivos (Vélez et al., 2008). Las variaciones de este parámetro reflejan que a pH bajo la población disminuye e incluso inhibe el proceso de fijación de nitrógeno y de nitrificación. La mayor parte de las bacterias se desarrollan mejor a pH neutro y ligeramente alcalino (Julca-Otiniano et al., 2006), valores que fueron encontrados en los suelos evaluados. Similarmente, las plantas tienen requerimientos para su desarrollo. La condición óptima de la mayoría de los cultivos para la asimilación de un amplio rango de nutrientes se presenta a pH ligeramente ácido (6.5) en el medio edáfico (Horneck et al., 2011). No obstante, rangos entre 5.0-9.0 son tolerables (NRCS, 2011). En la presente investigación, se encontró que los suelos agrícolas del Distrito de Riego de Repelón presentan valores de pH (6.93) adecuados para el establecimiento de cultivos y poblaciones de microorganismos.

Los suelos con textura franco arcillo arenosa y franco arcillo limosa generalmente presentan alto contenido de materia orgánica (Murphy et al., 2002). La materia orgánica en el suelo es un factor determinante en las comunidades de microorganismos, debido a que esta se correlaciona con la disponibilidad del nitrógeno y fósforo, incluso con la productividad de los cultivos (Cerón & Fabio, 2012). Aunque se encontraron variaciones en: materia orgánica y carbono orgánico en los diferentes suelos evaluados, los valores mayores a 2% son considerados como niveles buenos para el establecimiento de microorganismos en el suelo (ICA, 2008). Esta

característica se encuentra asociada con los suelos en reposo y junto con la baja precipitación se facilita la acumulación de residuos orgánicos que son transformados en materia orgánica. Las tierras con cobertura vegetal tienen niveles más altos de materia orgánica (Corbella & Fernández, 2010). Igualmente, Vélez et al., (2008) reportaron porcentajes de materia orgánica entre 2.64% y 6.60%, posiblemente relacionados con los resultados de pH del suelo, debido a que se observó una relación entre la materia orgánica y la alcalinidad o acidez de la muestra de suelo, a mayor alcalinidad menor porcentaje de materia orgánica, y a mayor acidez mayor porcentaje de materia orgánica. Por otra parte, las altas precipitaciones generan pérdidas del recurso edáfico debido al arrastre de partículas de suelo y con estas, la materia orgánica (FUNDESYRAM, 2014).

Para el desarrollo de las plantas, el fósforo es un elemento esencial o macronutriente. En las raíces estimula el crecimiento y el desarrollo vigoroso, favoreciendo la floración y fructificación, al igual que la cantidad y calidad de los frutos y semillas (Villar & Rodríguez 2014). Adicionalmente, este elemento es importante para las bacterias debido a que favorece los procesos de mineralización, de esta manera, el desarrollo y rendimiento de los cultivos es beneficiado (Font et al., 2002). Generalmente el fósforo se acumula en la capa superficial del suelo y la disponibilidad de los compuestos del fósforo depende del pH, por lo que abunda más en pH neutro (Mackenzie et al., 2004). El elevado contenido de fósforo total encontrado en los suelos agrícolas del Distrito de Riego de Repelón, es consecuencia de la alta concentración fija, resultado de la poca movilidad de este elemento y los valores de pH del suelo estos se encontraron entre ligeramente ácidos y neutros.

La humedad del suelo presentó variaciones entre 0.92 – 5.99 %. Algunas zonas presentaron valores bajos debido a las condiciones climáticas de la zona debido a que durante la evaluación de los suelos era la temporada de sequía. Estudios realizados por el IGAC (2007), reportan que los suelos del municipio de Repelón se caracterizan por tener un porcentaje promedio de humedad de 4.45%. Existen diferentes factores que pueden influenciar la humedad del suelo. La presencia de plantas de cobertura evita la evapotranspiración del suelo o la presencia de altos contenidos de arcilla favorece la retención de agua (Mackenzie et al., 2004). En esta investigación, la mayor parte de los suelos evaluados se encontraban con cobertura vegetal (hierba) justificando los valores de humedad en el suelo.

El suelo se reconoce como medio natural para el crecimiento de las plantas y microorganismos, estos se ven influenciados por las propiedades físicas y químicas del mismo (Sivila de Cary & Hevé, 1994). La diversidad y densidad de las comunidades de bacterias del suelo están determinadas por factores bióticos y abióticos. De hecho, el crecimiento de las poblaciones microbianas depende del tipo de suelo, las especies vegetales y el uso del suelo y, las actividades de manejo, debido a que estos factores influyen en la estructura de la comunidad bacteriana (Viera & Nahas, 2005; Hamid- Dar et al., 2012, Mohammad, 2015). Vélez et al., (2008) reportaron que existe una correlación entre el pH del suelo y las bacterias. Suelos donde el pH es ligeramente ácido o básico es más probable el crecimiento de estas. Una modificación en este parámetro puede activar o casi inactivar las enzimas de los microorganismos, actuando sobre la disponibilidad o fijación de minerales nutritivos. Aunque en esta investigación no se encontró correlación entre los diferentes parámetros como pH del suelo, carbono y materia orgánica con la densidad poblacional de las cepas de bacterias fijadoras de nitrógeno, Meliani et al., (2012) afirman que las características edáficas influyen en la presencia o ausencia, diversidad

y abundancia de microorganismos presentes en el suelo. Únicamente, las colonias aisladas de la cepa-2 presentaron correlación con el fósforo disponible en el suelo. Esta correlación se debe posiblemente a que esta cepa-2 pertenezca al género *Azotobacter*, la cual se conoce como bacteria solubilizadora de fosfatos, puesto que tienen capacidad de disolver el fosfato del suelo continuamente mediante la mineralización de fosfato inorgánico a fosfato orgánico, proporcionando el fósforo que puede ser utilizado por las plantas (Jana, 2007). De igual manera, esta característica posiblemente justifica la densidad poblacional con relación a las altas concentraciones de fósforo disponible. Madigan et al., (1997) manifiestan que los niveles altos de fósforo pueden favorecer la presencia de *Azotobacter* en el suelo y esto se puede deber a que el fósforo favorece el crecimiento de microorganismos debido a su rol estructural en membranas citoplasmáticas (fosfolípidos) en todos los seres vivos y por su participación en la acumulación y liberación de energía en el metabolismo celular.

En esta investigación se encontró que las colonias aisladas de la cepa-3 en la zona norte del Distrito de Riego de Repelón presentaron la mayor población ( $1.6 \times 10^8$  UFC/g de suelo). Laldinthar (2015) reporta que la cantidad de materia orgánica se relaciona con una mayor actividad microbiana.

Las características del suelo son herramientas valiosas para el agricultor. Mediante estos análisis es posible conocer en detalle las necesidades de los nutrientes del suelo, las condiciones de habitabilidad de organismos edáficos y las propiedades hídricas. Con esta información, se pueden implementar estrategias para el mantenimiento de la diversidad de microorganismos edáficos y mejorar los rendimientos de los cultivos (Sola, s.f.). No obstante, teniendo en cuenta las problemáticas ambientales generadas por las actividades agrícolas, es importante utilizar

alternativas de productividad sustentable fundamentadas en los procesos biológicos para reducir el impacto negativo en el medio ambiente generado por la utilización de insumos sintéticos. Por tal motivo, la asociación entre las bacterias fijadoras de nitrógeno con las plantas es considerada como una alternativa (biofertilizantes) para la fertilización nitrogenada, favoreciendo el desarrollo, crecimiento y producción de una manera eficiente, económica y sustentable. Los resultados indican que se obtuvo el mismo rendimiento con la disminución al 50% de fertilización nitrogenada, reflejando menor impacto ambiental y reducción en los costos por la aplicación de estos fertilizantes químicos (Mantilla et al., 2007).

Los aislamientos realizados en esta investigación ofrecen un indicio de la diversidad de bacterias que se pueden encontrar en los suelos agrícolas del Distrito de Riego de Repelón. Es importante resaltar que los procesos agrícolas así como el manejo de los recursos vegetales, agua y suelo son componentes que influyen en tanto en la diversidad como en la densidad de los microorganismos edáficos. Las prácticas inadecuadas en el manejo de estos recursos a mediano y largo plazo se pueden reflejar en la pérdida de fertilidad de los suelos y como consecuencia, la aridez que no permitirá el desarrollo de actividades agrícolas.

## 8. Conclusión

El uso actual de los suelos agrícolas del Distrito de Riego de Repelón y las condiciones fisicoquímicas son favorables para el crecimiento de las bacterias fijadoras de nitrógeno. Estas características edáficas se encuentran asociadas a la falta de actividad agrícola, puesto que durante la época seca la escasa precipitación y la falta de operación del distrito de riego (por los bajos niveles del Embalse del Guájaro) mejoran el contenido de materia orgánica y la acumulación de fósforo. Igualmente, las pequeñas áreas cultivadas no requieren la aplicación de insumos químicos, debido a que las prácticas de control son manuales y la producción es para el abastecimiento personal de los agricultores.

Los resultados obtenidos en esta investigación indican variabilidad en la densidad poblacional de bacterias fijadora de nitrógeno entre los puntos muestreados. La zona norte del distrito presentó mayores poblaciones de las cepas 1 y 3, por el contrario en la zona centro, la cepa 2. En la zona sur se observó menor densidad poblacional, esta variabilidad posiblemente se encuentra asociada con los parámetros fisicoquímicos del suelo, debido a los bajos valores de pH y materia orgánica. De igual manera, se identificó que las colonias aisladas de la cepa-3 presentaron mayor densidad poblacional. Por otra parte, en la correlación de las UFC/g de suelo con parámetros fisicoquímicos del suelo evaluados, únicamente la cepa-2 mostró correlación con el fósforo total, esta cepa posiblemente es solubilizadora de fosfato.

Esta investigación representa el primer reporte de estudio microbiológico en el Distrito de Riego de Repelón. Teniendo en cuenta su importancia como despensa agrícola, es importante

identificar la microbiota, especialmente las bacterias fijadoras de nitrógeno para reducir el uso de fertilizantes inorgánicos e implementar prácticas amigables con el medio ambiente que permitan la sostenibilidad ecológica y económica de la agricultura.

### Bibliografía

- AEFA (Asociación Española de Fabricantes de Agronutrientes). (2017). Uso de microorganismos en la agricultura. Valencia: AEFA 1997 - 2017. Obtenido de <https://aeфа-agronutrientes.org/uso-de-microorganismos-en-la-agricultura>
- Alexander M., (1980). Introducción a la microbiología del suelo, AGT, México, 491 p.
- Aquilanti L, Favilli F, Clementi F. (2004). Comparison of different strategies for isolation and preliminar identification of Azotobacter from soil samples. Soil Biology and Biochemistry 36:1475-1483.
- Autor Corporativo, (2008). Norma Técnica Colombiana NTC 5264. CALIDAD DEL SUELO. DETERMINACION DEL PH. Bogota: ICONTEC.
- Baca, B. E., Soto Urzúa, L., & Pardo Ruíz, M.P. (2000). Fijación biológica de nitrógeno. Elementos 38, 43-49. Obtenido de <http://www.elementos.buap.mx/num38/pdf/43.pdf>
- Balkcom, K. & Reeves, D. (2005). Sunn Hemp utilized as a legume cover crop for corn Production. Agronomy Journal, 97, 26-31.
- Barassi, C. A., R.J. Sueldo, C.M. Creus, L.E Carrozzi, E.M. Casanovas & M.A. Pereyra. (2007). Azospirillum spp., a dynamic soil bacterium favorable to vegetable crop production. Dynamic Soil Dynamic Plant 1(2), 68-82.



- Bashan, Y. & Holguín G. (1998). Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol – PGPB (plant growth promoting bacteria) and PGPB. *Soil Biology Biochemistry*, 30, 1225–1228.
- Bautista-Cruz, A., Etchevers Barra, J., Del Castillo, R. F. & Gutiérrez, C. (2004). La calidad del suelo y sus indicadores. *Ecosistemas*, 13(2); 90-97.
- Becking, J. (2006). The family Azotobacteraceae. *Prokaryotes*, 6, 759-783
- Caballero, J. (2002). El género *Azospirillum*. Capítulo 10. Obtenido de <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap10/>. P. 565 – A. México.
- California, U. O. (2016). Biology LibreTexts. From How Microbes Grow: [http://bio.libretexts.org/TextMaps/Map%3A\\_Microbiology\\_\(OpenStax\)/09%3A\\_Microbial\\_Growth/9.1%3A\\_How\\_Microbes\\_Grow](http://bio.libretexts.org/TextMaps/Map%3A_Microbiology_(OpenStax)/09%3A_Microbial_Growth/9.1%3A_How_Microbes_Grow)
- Cardoso E., Tsai S., Neves M.C., (1992). Microbiología solo, SECS, Campinas, Brasil. p. 2.
- Carrasco, J. & Riquelme, J. (2003). Métodos y Prácticas de Conservación de Suelos y Aguas. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, INIA. Rancagua, Chile. Boletín INIA

N° 103. 132 p.

Castellanos, D. M. O., Zabala, L. B. B., Botía, D. M. R., Garrido, M. F. R., Buitrago, R. R.

B., & Baldani, V. L. D. (2010). Caracterización de bacterias diazotróficas asimbióticas asociadas al eucalipto (*Eucalyptus* sp.) en Codazzi, César. *Acta Biológica Colombiana*, 15(3), 107.

Castillo, R. M. (2009). Sistemas de producción agrícola sostenible. *Tecnología en Marcha*, 22(2), 23.

Celaya-Michel, H. & Castellanos-Villegas, A. (2011). Mineralización de nitrógeno en el suelo de zonas áridas y semiáridas. *Terra Latinoamericana*, 29(3): 343-356.

Cerón, L. E., & Aristizábal, F. A. (2012). Dinámica del ciclo del nitrógeno y fósforo en suelos. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 285-295.

Climate, Data. 2017. National Center for Environmental Information. [Online] Available at: <http://es.climate-data.org/location/50352/> [Accessed 1 Marzo 2017].

Consentino, J. & Costantini, A. (2000). Evaluación de algunas formas de carbono como indicadores de degradación en Argiudoles vérticos de Entre Ríos, Argentina. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 20(1), 31-34.

Corbella, R., & Fernández, J. (2010). *Materia orgánica del suelo*. Tucumán, Argentina:

Universidad Nacional de Tucumán.

Cordero, A. P., Tuberquia-Sierra, A., & Amell-Jimenez, D. (2014). Actividad in vitro de bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno y solubilizadoras de fosfatos. *Agronomía Mesoamericana*, 25(2), 12.

Córdoba-Bautista, Y., Rivera-Cruz, M., Ferrara-Cerrato, R., Obrador-Olán, J., & Córdoba-Ávalos, V. (2009). Detección de Bacterias benéficas en suelo con banano (Musa AAA Simmonds) Cultivar "Gran Enano" y su potencial para integrar un biofertilizante. *Universidad y Ciencia Trópico Humedo*, 25(3), 253 - 265.

Cuadrado, B., Rubio, G. & Santos, W. (2009). Caracterización de cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* (con habilidad de nodulación) seleccionados de los cultivos de fríjol caupi (*Vigna unguiculata*) como potenciales bioinóculos. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, (1), 78-104.

De Bashan, L. E., Holguin, G., Glick, B. R., & Bashan, Y. (2007). Bacterias promotoras de crecimiento en plantas para propósitos agrícolas y ambientales. *Microbiología agrícola. Hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biológico, planta-microorganismo*. México: Editorial Trillas, 170-224.

Dahal, B., G. Nanda-Kafle, L. Perkins and V.S. Brozel. 2017. Diversity of free-living nitrogen

fixing Streptomyces in soils of the badlands of South Dakota. Microbiological Research 195: 31-39.

Di Rienzo, J.; Casanoves, F.; Balzarini, M.; Gonzalez, M.; Tablada, M.; Robledo, C. (2012).

Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Obtenido de <http://www.infostat.com.ar>.

Döbereiner, Johanna, Pedrosa, O. Fabio. (1990). Nitrogen-fixing Bacteria in

Nonleguminous Crop. Plants. Brock/Springer Series in Contemporary Bioscience. E.U. pp. 153.

Escobar, C., Horna, Y., Carreño, C., & Mendoza, G. (2011). Caracterización de cepas

nativas de *Azotobacter* spp. y su efecto en el desarrollo de *Lycopersicon esculentum* Mill." tomate" en Lambayeque. Scientia Agropecuaria, 2(1), 39-49.

Esermann E. & McLaren A.D., (1961). "Contribution of rhizosphere organisms to the total

capacity of plants to utilize organic nutrients", en Plant and Soil, 15 (3), pp. 243-259.

FAO (Food and Agriculture Organization). (2002). Marco para las buenas prácticas

agrícolas. Obtenido de <http://www.fao.org/ag/esp/revista/faogapes.pdf>

FAO (Food and Agriculture Organization). (2016). Materia orgánica y actividad biológica.

Obtenido de [http://www.fao.org/ag/Ca/Training\\_Materials/CD27-Spanish/ba/organic\\_matter.pdf](http://www.fao.org/ag/Ca/Training_Materials/CD27-Spanish/ba/organic_matter.pdf).

FAO (Food and Agriculture Organization). (s.f.). Conservación de los recursos naturales para una Agricultura sostenible. Fertilidad del suelo. Obtenido de [http://www.fao.org/ag/ca/training\\_materials/cd27-spanish/sf/soil\\_fertility.pdf](http://www.fao.org/ag/ca/training_materials/cd27-spanish/sf/soil_fertility.pdf)

Fernández-Pascual, M., María, N. D., & Felipe, M. (2002). Fijación biológica del nitrógeno: Factores limitantes. Obtenido de [http://digital.csic.es/bitstream/10261/128283/1/Fijaci%C3%B3n%20Biol%C3%B3gica391\(MC%20F%20Pascual\).pdf](http://digital.csic.es/bitstream/10261/128283/1/Fijaci%C3%B3n%20Biol%C3%B3gica391(MC%20F%20Pascual).pdf).

Ferrera, R. and A. Alarcón. 2001. La microbiología del suelo en la agricultura sostenible. *Ciencia Ergo Sum* 8(2): 175-183.

Flores-Gallegos, A. C., Contreras Esquivel, J. C., & Humberto, M. (2012). Aislamiento e identificación de cepas nativas del suelo mexicano del género *Azotobacter*. *Revista Científica*, 4(8), 1-10.

Font, L., Calero, B., & Del Castillo, A. (2002). Estado microbiológico del suelo, base del manejo integral de un agroecosistema citrícola. *LEISA Revista de Agroecología*. Obtenido de <http://www.agriculturesnetwork.org/magazines/latin-america/3-hacia-la-recuperacion-de-la-vida-en-el-suelo/estado-microbiologico-del-suelo-base-del->

maneo/at\_downloas/article\_pdf.

Fundación Banco Santander. (2007). *Manuales de Desarrollo Sostenible*. Investigación

Gráfica, S.A. Obtenido de <http://www.cervantesvirtual.com/descargaPdf/manuales-de-desarrollo-sostenible-5-practicas-para-la-sostenibilidad-agraria/>

Fundación para el Desarrollo Socioeconómico y Restauración Ambiental.

(FUNDESYRAM). 2014. Manejo de la humedad del suelo. Obtenido de <http://www.fundesyram.info/biblioteca.php?id=4332>

García, S. C. (2011). Bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno. Cuadernos del Tomás, (3), 173-186.

Gianinazzi-Pearson V., Azcon-Aguilar C. (1991). “Fijación y movilización biológica de nutrientes”, en Fijación y movilización biológica de nitrógeno y micorriza. Consejo Superior de Investigación Científica, Olivares J. Barea JM. (EDIT), Madrid, Vol II, pp. 175-202.

Griffin, T., Liebman, M. & Jemison, J. (2000). Cover crops for sweet corn production in a short season environment. *Agronomy Journal*, 92,144-151.

Gupta, V. S. and M. M. Roper. 2010. Protection of free-living nitrogen-fixing bacteria within the

soil matrix. Soil & Tillage Research 109: 50-54.

Hamid-Dar, G. Kamili, A. Nazir, R., Bandh, S. and R. Ahmad-Bhat. (2012). A preliminary study of colony forming units of bacteria from the soil of Yusmarg Forest, Kashmir Valley India. International Journal of Current Research 4(12): 467-472.

Horneck, D. A., Sullivan, D. M., Owen, J. S., & Hart, J. M. (2011). Soil test interpretation guide. From <https://catalog.extension.oregonstate.edu/ec1478>

Ibarra-Sánchez, C. L. (2012). Diversidad de bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas de suelo de chinampa y su efecto en plantas de interés agrícola. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional. México.

IGAC (Instituto Geográfico Agustín Codazzi). (2007). Métodos analíticos del laboratorio de suelos. Imprenta Nacional de Colombia, Bogotá.

IGAC (Instituto Geográfico Agustín Codazzi). (2008). Estudio general de suelos y zonificación de tierras. Departamento del Atlántico. Imprenta Nacional de Colombia, Bogotá.

Ilyas, N., Bano, A., & Iqbal, S. (2008). Variation in Rhizobium and Azospirillum strains isolated from maize growing in arid and semiarid areas. International Journal of

Agriculture & Biology, 10(6), 612-618.

Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). (2012). El barbecho y la eficiencia productiva. Obtenido de <http://inta.gob.ar/noticias/el-barbecho-y-la-eficiencia-productiva>.

Iturri, L. A. and D. E. Buschiazso. 2016. Light acidification in N-fertilizer losses soils along a limo sequence affected chemical and mineralogical properties in short-term. *Catena* 139: 92-98.

Jana, B. B. (2007). Distribution pattern and role of phosphate solubilizing bacteria in the enhancement of fertilizer value of rock phosphate in aquaculture ponds: state of the art. First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization, (pp. 229-238).

Jiménez, D., Montaña, J. & Martínez, M. (2011). Characterization of free nitrogen fixing bacteria of the genus *Azotobacter* in organic vegetable-grown colombian soils. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42, 846-858.

Jiménez, M. S. (2007). Fijación biológica de nitrógeno por leguminosas arbóreas para sombra de café en Puerto Rico. Tesis de Maestría. Universidad de Puerto Rico. Puerto Rico.

Jimenez S., T., Huelgas S., L. C., Perez T., L. G., Vazquez C., L. A., & Tapia H., A. (s.f.).



Estudio poblacional de *Azospirillum* spp. en plantas de café (*coffea arabica* L.) en las principales regiones cafetaleras. Zaragoza, México.

Julca, A., Meneses, L., Blas, R., & Bello, S. (2006). La materia orgánica, importancia y experiencia de su uso en la agricultura. *Idesia* (Arica), 24(1), 49-61. Obtenido de <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-34292006000100009>

Kenneddy C, Rudnick P, MacDonald M, Melton T. (2005). Genus III: *Azotobacter*. En: Garrity GM (ed) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Second edition. Vol. Two. The Proteobacteria. Part B. The Gammaproteobacteria. Springer, New York, pp 384-402

Kennedy, I. R., Choudhury, A. T. M. A., & Kecskés, M. L. (2004). Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited?. *Soil Biology Biochemistry*, 36(8), 1229-1244.

Khanafari A, Sepahi AA, Mogharab M. (2006). Production and recovery of poly (3-hydroxybutyrate from whey degradation by *Azotobacter*. *Iranian Journal of Environmental Health Science & Engineering* 3 (3):193-198.

Khanafari A, Sepahei A. (2007). Alginate biopolymer production by *Azotobacter chroococcum* from whey degradation. *International Journal of Environmental*

Science and Technology 4(4):427-32.

Killian M., Steiner U., Krebs B., Junge H., Schmiedeknecht G. & Hain R. (2001). FZB24

*Bacillus subtilis* Mode of Action of a Microbial Agent Enhancing Plant Vitality.

Pflanzenschutz - Nachrichten Bayer. 1: 72-93.

Kuiper, I., Lagendijk, E., Bloember, G., & Lugtenberg, B. J. (2004). Rhizoremediation: a

beneficial plant microbe interaction. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal*, 17(1),

6-15.

Laldinthar, R. (2015). Relationship between Soil Bacterial Population and Various Physico-

Chemical Properties at Two Broadleaved Forest Stands of Meghalaya Differing in

Altitudes. *Transcriptomics: Open Access*, 2-7.

Mackenzie L. Davis & Susan J. Masten. (2004). *Ingeniería y ciencias ambientales*. Editorial

McGraw Hill, capítulo 7, 266 pp.

Madigan M., Martinko J. & Parker J. (1997). *Brock Biología de los Microorganismos*.

Octava Edición. Prentice Hall.EEUU.

Mahmood, K. W., Yang, N., Kidhwar, Z., Rajputy, A. and A. Arijo. 2006. Study of cellulolytic

soil fungi and two nova species and new medium. Journal of Shejiang University Science  
7: 459-466.

Mantilla Paredes, A. J., Cardona, G. I., Peña Venegas, Murcia Uriel, C. P., Rodríguez, M,  
& Zambrano, M. M. (2009). Distribución de bacterias potencialmente fijadoras de  
nitrógeno y su relación con parámetros fisicoquímicos en suelos con tres coberturas  
vegetales en el sur de la Amazonia colombiana. Revista de Biología Tropical, 57(4), 915-  
927.

Mantilla, C. L., Villalba-Anaya, M., & Oviedo, L. E. (2007). Bacterias fijadoras  
asimbióticas de mitropogeno de la zona agrícola de San Carlos, Córdoba, Colombia.  
Revista Colombiana de Biotecnología, 10(2), 6-14.

Martínez-Castillo, R. (2009). Sistemas de producción agrícola sostenible. Revista Tecnología en  
Marcha, 22(2), 23.

Martínez, T. J.; López, I. (2000). Rhizobium y su destacada simbiosis con plantas.198p.

Martínez-Mera, E., Valencia, E. and H. Cuevas. (2016). Evaluación del rendimiento de

maíz dulce (*Zea mays* "Suresweet") con las leguminosas cobertoras mucuna enana (*Mucuna pruriens*) y crotalaria (*Crotalaria juncea* "Tropic sun") en un oxisol de Puerto Rico. *The Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico* 100(1): 57-70.

Mayz Figueroa, J. (2004). Fijación biológica de nitrógeno. *Revista UDO Agrícola*, 4(1),1-20.

Meliani, A., Bensoltane, A., & Mederbel, K. 18 de octubre de (2012). Microbial Diversity and Abundance in Soil: Related to Plant and Soil Type. *American Journal of Plant Nutrition and Fertilization Technology*, 2(1), 10-18.

Méndez, J. P., Ramírez, C. A. G., Gutiérrez, A. D. R., & García, F. P. (2009).

Contaminación y fitotoxicidad en plantas por metales pesados provenientes de suelos y agua. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 10(1), 29-44.

Mendez Gomez, M., Castro Mercado, E., & Garcia Pineda, E. Julio de (2014).

*Azospirillum* una rizobacteria con uso potencial en la agricultura. *Biologicas*, 16(1), 11-18.

Molina-Favero C, Creus CM, Simontacchi M, Puntarulo S, Lamattina L. (2008). Aerobic

nitric oxide production by *Azospirillum brasilense* Sp245 and its influence on root architecture in tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal*. 21: 1001-9.

Molina Hernandez, E., Rosas Morales, M., Rios Cotes, A., Tapia Hernandez, A., Martinez

Ayala, A., & Jimenez Salgado, T. (s.f.). Aislamiento y Caracterizacion de cepas de *Azospirillum* en Plantas de *Jatropha Curcas* L. Tlaxcala, Mexico.

Murphy, S., Giménez, D., Muldowney, L., & Heckman, J. (2002). Soil organic matter level

and interpretaion. From

<http://njaes.rutgers.edu/pubs/publication.asp?pid=FS1136>Nutriobiol. (s.f.). Agricultura

Orgánica. Obtenido de

[http://www.controlbiologico.com/ep\\_Azotobacter\\_Azospirillum.htm](http://www.controlbiologico.com/ep_Azotobacter_Azospirillum.htm).

Navarro, S.; Navarro, G. 2003. Química Agrícola: El Suelo y los elementos químicos

esenciales para la vida vegetal. Ed. Mundi Prensa. Madrid, España. p 183 – 215.

NRCS. (2011). Soil quality for environmental matter level and interpretation. Obtenido de:

[http://soilquality.org/indicators/soil\\_ph.html](http://soilquality.org/indicators/soil_ph.html)

Oyaga, R., Torres Bejarano, F. & Cantero, R. (2014). Aproximación al diseño de un

- Modelo Ecológico Social para la ecorregión Embalse del Guájaro. Revista UNIMAR, 32(2), 129-144.
- Torres Bejarano, F., Oyaga, R. & Cantero, R. (2014). Ilustración de la ubicación general del Distrito de Riego de Repelón. [Figura 1]. Recuperado de [http://www.umariana.edu.co/ojs-editorial/index.php/unimar/article/viewFile/860/pdf\\_8](http://www.umariana.edu.co/ojs-editorial/index.php/unimar/article/viewFile/860/pdf_8)
- Parra, Y., & Cuevas, F. (2002). Potencialidades de Azospirillum como inoculante para la agricultura. Cultivos Tropicales, 23(3), 31-42.
- Pahuara Hernandez, Doris; Zúñiga Dávila, Doris. (2002). Efecto del fósforo sobre la población microbiana en suelos con pasturas en la zona altoandina de Junín. Ecología Aplicada, diciembre, 57-64.
- Pedraza, R. (2008). Recent advances in nitrogen-fixing acetic acid bacteria. International Journal of Food Microbiology. 125:25-35.
- Pérez, A., Grisales, T., & Fuentes, J. (2011). Determinación de morfotipos nativos de *Rhizobium* asociados a la leguminosa *Teramnus volubilis* Sw en fincas ganaderas del municipio de Tolú en el departamento de Sucre. Revista Colombiana de Ciencia Animal, 3(1), 62-89.

- Pérez C, A., Rojas S, J., & Fuentes C, J. (2010). Diversidad de bacterias endófitas asociadas a raíces del pasto colosuana (*bothriochloa pertusa*) en tres localidades del departamento de Sucre, Colombia. *Acta Biológica Colombiana*, 15(2), 219-228. Obtenido de [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-548X2010000200015&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-548X2010000200015&lng=en&tlng=es).
- Pérez, R., Pérez, A., & Vertel, M. (2010). Caracterización nutricional, fisicoquímica y microbiológica de tres abonos orgánicos para uso en agroecosistemas de pasturas en la subregión sabanas del departamento de Sucre, Colombia. *Tumbaga*, 1(5), 27-37.
- Perez J. and M. Casas. (2005). Study of the interaction plant- *Azospirillum* in sugar cane (*Saccharum* sp.) Crop. Obtenido de: <http://www.redalyc.org/pdf/1932/193216160002.pdf>.
- Philippot, L., & Germon, J.C. (2005). Contribution of bacteria to initial input and cycling of nitrogen in soils. In F. Buscot & A. Varma (Eds.). *Microorganisms in Soils: Roles in Genesis and Functions* (pp. 159-176). Springer.
- Pimentel, D., (1996). Green revolution agricultural and chemical hazards. *The Science of the Total Environment* 188: 86-98.
- Plaza Bolaños, P., Padilla Sánchez, J. A., Garrido Frenich, A., Romero González, R., &

- Martínez Vidal, J. L. (2012). Evaluation of soil contamination in intensive agricultural areas by pesticides and organic pollutants: south-eastern Spain as a case study. *Journal of Environmental Monitoring*, 14,1181-1188. Doi: 10.1039/C2EM10993J
- Rubio, E. (2003). Caracterización molecular y funcional de bacterias del género *Azotobacter* aisladas de suelos de la República Argentina. El rol de las auxinas en la respuesta a la inoculación de trigo. Tesis de maestría. Universidad de Buenos Aires. Argentina.
- Rueda D, Valencia G, Soria N, Rueda BB, Manjunatha B, Kundapur RR, Selvanayagam M. Effect of *Azospirillum* spp. and *Azotobacter* spp. on the growth and yield of strawberry (*Fragaria vesca*) in hydroponic system under different nitrogen levels. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, (2016); 6 (01): 048-054.
- Sánchez Zamora, P., Gallardo Cobos, R. y Ceña Delgado, F. (2016). La noción de resiliencia en el análisis de las dinámicas territoriales rurales: Una aproximación al concepto mediante un enfoque territorial. *Cuadernos de Desarrollo Rural*, 13(77), 93-116. Obtenido de <http://dx.doi.org/10.11144/Javeriana.cdr13-77.nrad>
- Silva Arroyave, S.M., & Correa Restrepo, F.J. (2009). Análisis de la contaminación del suelo: revisión de la normativa y posibilidades de regulación económica. *Semestre Económico*, 12(23), 13-34.



Sivila de Cary, R., & Hevé, D. (1994). El estado microbiológico del suelo, indicador de una restauración de la fertilidad. En D.Herve, D. Genin, & G. Riviere (Eds). Dinámicas del descanso de la tierra en los andes (185-197 pp). La Paz, Bolivia: IBTA - ORSTOM.

SMART! Fertilizer Management, (2017). Materia orgánica y actividad biológica. Obtenido de <http://www.smart-fertilizer.com/es/articles/phosphorus>. Acceso 03 de abril de 2017.

Sola Redondo, F. (s.f.). CSR Servicios. Obtenido de Suelos:  
[http://www.csr servicios.es/joomla/index.php?option=com\\_content&view=article&id=133&catid=36](http://www.csr servicios.es/joomla/index.php?option=com_content&view=article&id=133&catid=36)

Spaepen S, Van Derleyden J, Okon Y. (2009). Plant growth-promoting actions of rhizobacteria. *Advances in Botanical Research*. 51:283–320.

Thavasi R, Subramanyam Nambaru VRM, Jayalakshmi S, Balasubramanian T, Banat IM. (2009). Biosurfactant Production by *Azotobacter chroococcum* Isolated from the Marine Environment. *Marine Biotechnology* 11:551-556.

Tien TM, Gaskins MH, Hubbell DH. (1979). Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). *Appl. Environ. Microbiol.* 37: 1016-24.

Tonitto, C., David, M. & Drinkwater, L. (2006). Replacing bare fallows with cover crops in fertilizer-intensive cropping systems: A meta-analysis of crop yield and N dynamics. *Agriculture, Ecosystem & Environment*, 112,58-72.

Universitat de les Illes Balears. (2010). Prácticas de Microbiología. Obtenido de <http://www.uib.cat/depart/dba/microbiologia/micro2/practicas.pdf>.

Vallejo, Margarita M, Bonilla C, Carmen R, & Castilla, Luis A. (2008). Evaluación de la asociación bacterias fijadoras de nitrógeno - líneas interespecíficas de arroz-nitrógeno, en Typic haplustalf. Ibagué, Colombia. *Acta Agronómica*, 57(1), 43-49. Obtenido de [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-28122008000100006&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-28122008000100006&lng=en&tlng=es).

Vélez, P. C., Meneses, L. R., & Dávila, D. Z. (2008). Estudio de las poblaciones microbianas de la rizósfera del cultivo de papa (*Solanum tuberosum*) en zonas altoandinas. *Ecología Aplicada*, 7(1), 2.

Vieira, F. C. and E. Nahas. (2005). Comparision of microbial numbers in soils by using various culture media and temperatures. *Microbiological Research* 3(1): 62-89.

Villa Del Río, J. D. (1998). Municipio De Repelón: Despensa agrícola y pesquera del caribe. Obtenido de [http://www.repelon-atlantico.gov.co/apc-aa](http://www.repelon-atlantico.gov.co/apc-aa/files/.../MINILIBRO_REPELON.doc) files/.../MINILIBRO\_REPELON.doc.

Villar, E. M., & Rodríguez, M. S. A. (2014). Fertilidad del suelo y parámetros que la definen. Obtenido de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/libro?codigo=267902>

Wang, E., Martínez-Romer, J., & López Lara, I. (2002). Rhizobium y su destacada simbiosis con plantas. Capítulo 8. Obtenido de <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap8/>. México.

Yanine, H. F. (2010). Evaluación de la diversidad de bacterias degradadoras de hidrocarburos aislados de suelos de las cuencas de los ríos Otún y la Vieja. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.

## Anexos

### Anexo 1. Medios de cultivo

Cepa-1.

Medio: Levadura Manitol Agar.

Extracto de levadura	1.5 g/L
Manitol	10 g/L
Sulfato de Magnesio	0.20 g/L
Dipotasio Sulfato	0.50 g/L
Agar – agar	15 g/L
Cloruro de Sodio	0.20 g/L

Cepa-2.

Medio: Ashbys Manitol Agar.

Manitol	20 g/L
Dipotasio Sulfato	0.20 g/L
Sulfato de Magnesio	0.20 g/L
Sulfato de Sodio	0.10 g/L
Carbonato de Calcio	5 g/L
Agar – Agar	15 g/L
Cloruro de Sodio	0.20 g/L

Cepa-3.

Medio: Agar Rojo Congo.

Dipotasio Sulfato	0.5 g/L
Sulfato de Magnesio	0.20 g/L
Cloruro de sodio	0.1 g/L

Extracto de levadura	0.5 g/L
Cloruro Férrico	0.015 g/L
Ácido Málico	5 g/L
Hidróxido de Potasio	4.8 g/L
Agar – agar	20 g/L



Figura 15. Medios de cultivo.

## Anexo 2. Tinción de Gram

Consistió en tomar la colonia con ayuda de un hisopo y llevarla sobre el portaobjeto, luego se pasó unas veces por el mechero para fijar la muestra, se procedió a agregarle violeta de genciana por 60 segundos, se lavó con agua, seguido se agregó una gota de lugol, por 60 segundos, se lavó la muestra para agregarle una gota de alcohol acetona por unos 30 segundos aproximadamente hasta obtener decoloración, posteriormente se adicionó una gota de fucsina y finalmente se enjuagó con agua. Una vez terminado el procedimiento, se observó en el

microscopio con un objetivo de 100X, la coloración rosa correspondió a bacterias Gram negativas, característica de bacterias fijadoras de nitrógeno (*Prácticas de Microbiología*, 2010).

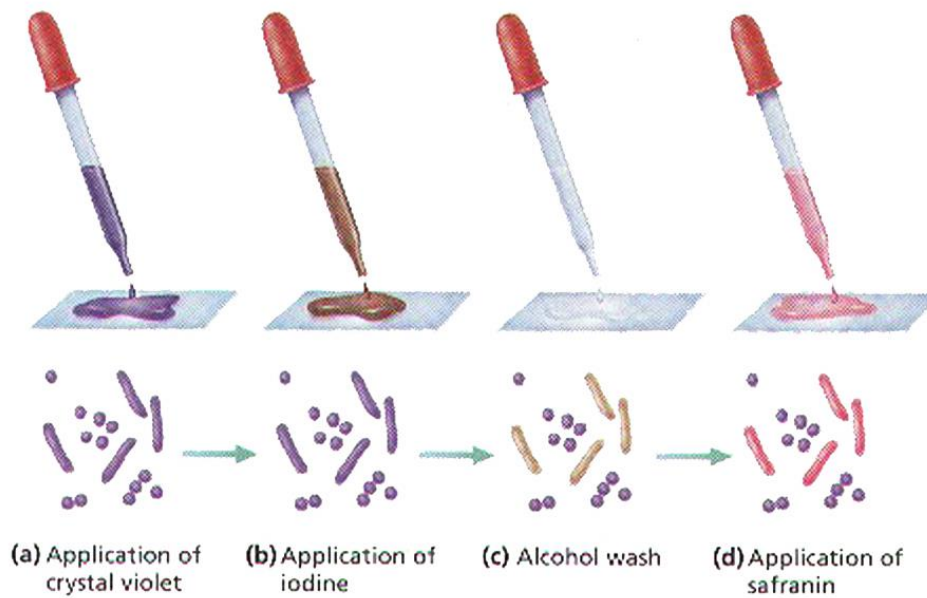


Figura 16. Tinción de Gram. Tomado de: (<https://goo.gl/u4dxCQ>)

### Anexo 3. Fase de campo

#### Anexo 3.1. Toma de muestra



Figura 17. Recolección de la muestra para estudio en el DRR.



## Anexo 4. Fase de laboratorio

### Anexo 4.1. Siembra de Dilución en Placas de Petri



Figura 18. Siembra del inóculo realizada en los laboratorios CITA.

### Anexo 4.2. Titulación para hallar porcentaje de carbono orgánico



Figura 19. Titulación para determinar el porcentaje de carbono orgánico realizada en los laboratorios CITA.